



Cátia Vanessa de Almeida Santos

Licenciatura em Bioquímica

**Síntese de muropéptidos bacterianos
para estudos de interacção com a
vancomicina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioorgânica

Orientador: Doutora Maria Manuel B. Marques
Investigadora Auxiliar da FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Branco
Arguente: Doutora Filipa Marcelo
Vogais: Doutora Maria Manuel B. Marques
Doutora Filipa Marcelo



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro de 2014

Cátia Vanessa de Almeida Santos

Licenciatura em Bioquímica

**Síntese de muropéptidos bacterianos
para estudos de interacção com a
vancomicina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioorgânica

Orientador: Doutora Maria Manuel B. Marques
Investigadora Auxiliar da FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Branco
Arguente: Doutora Filipa Marcelo
Vogais: Doutora Maria Manuel B. Marques
Doutora Filipa Marcelo

Lisboa
Novembro de 2014

Cátia Vanessa de Almeida Santos

Licenciatura em Bioquímica

**Síntese de muropéptidos bacterianos
para estudos de interacção com a
vancomicina**

“Copyright” de Cátia Vanessa de Almeida Santos, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Lisboa

Novembro de 2014

Agradecimentos

Gostaria desde já agradecer à Doutora Maria Manuel Barata Marques, orientadora desta dissertação, por todos os conhecimentos transmitidos que me permitiram crescer no campo científico. Pelo exemplo de energia e optimismo que me ajudaram ao longo do caminho, incentivando-me sempre a querer fazer mais e melhor. Gostaria também de agradecer por toda a disponibilidade e preocupação não só a nível profissional mas também a nível pessoal.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia de apoio financeiro para os projectos PTDC / SAU-IMU / 111806/2009 e PTDC / QEQ-QOR / 2132/2012.

À rede de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química FCT-UNL, apoiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (RECI / BBB-BQB / 0230/2012), em particular ao Dr. Angelo Figueiredo, Ana Teresa Lopes e Cecília Bonifácio pelo incansável esforço no processamento das amostras para obtenção dos espectros.

Ao Dr. Nuno Costa pela paciência na purificação da amostra por HPLC e esforço para a obtenção do melhor resultado possível.

Ao Doutor Sérgio Filipe do Instituto de Tecnologia Química e Biológica pela disponibilização de todos os meios necessários aquando do trabalho realizado no seu laboratório e a todos os seu colaborado pela simpática e prestável recepção durante a minha estadia.

Às Doutoras Luísa Ferreira, Paula Branco, Ana Lourenço, Manuela Pereira e Ana Lobo pela boa disposição.

A todos os colegas que neste ano partilharam o laboratório 202, Luísa Carvalho, Tomé Silva, Alexandra Loupas e Fausto Queda, um obrigada pela ajuda, simpatia, bom ambiente e paciência. Um obrigada em particular à Marina Pires e Ana Luísa Maria, que não só mostraram ter muita paciência mas também me ouviram nos momentos mais difíceis.

Em particular ao meu núcleo familiar mais próximos, pais e irmão, por todas as ausências, cansaço, falta de paciência que aguentaram ao longo deste ano e por todo o apoio mostrado ao longo do meu percurso académico.

Por fim mas não menos importante um agradecimento muito especial ao Ricardo Faria que me aturou e apoiou nos bons e maus momentos, teve paciência a ouvir todos os meus desabafos e pelas inúmeras viagens que fez para me levar de volta a casa.

Resumo

A vancomicina é um membro da família dos antibióticos glicopeptídicos considerado de último recurso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. A fim de encontrar novos agentes para combater a resistência bacteriana é importante compreender os detalhes do mecanismo de acção de antibióticos glicopeptídicos. Estes antibióticos evitam a formação de peptidoglicano (PGN), o principal componente da parede celular bacteriana, o qual é constituído por uma cadeia alternada de *N*-acetil-glucosamina (GlucNAc) e ácido *N*-acetil-murâmico (MurNAc) ligados entre si por uma ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$, e estas cadeias ligam-se entre si por pequenas cadeias peptídicas.

Está bem estabelecido que a substituição do último aminoácido da cadeia peptídica ligada à unidade MurNAc altera a interacção das bactérias com os antibióticos glicopeptídicos. Até agora, os estudos de interacção foram limitados ao uso de dipéptidos e tripéptidos *N*-protegidos. De modo a clarificar a forma como as diferentes composições da unidade peptídica e da unidade de carbohidratados muropéptidos bacterianos afectam o reconhecimento pela vancomicina, desenvolvemos neste estudo a síntese de uma pequena biblioteca de muropéptidos e péptidos para futuros testes de interacção molecular.

A unidade MurNAc foi sintetizada por duas vias diferentes, envolvendo diferentes grupos protectores do grupo amina, o acetilo e o aliloxicarbonilo. O derivado de MurNAc **8** foi preparado em 7 passos, com 3% de rendimento pela via envolvendo a GlucNAc. Para a síntese das cadeias peptídicas utilizou-se a técnica de síntese de péptidos em fase sólida (SPFS). Os péptidos e muropéptidos foram sintetizados utilizando como terminal de D-Ala, Gly e D-Ser por SPFS com sucesso.

Os estudos preliminares de interacção entre a vancomicina e a unidade MurNAc sugerem uma possível alteração conformacional da vancomicina na presença de MurNAc, pelo que de futuro as interacções entre estas duas estruturas e os muropéptidos sintetizados deverão ser investigadas.

Palavras-chave: vancomicina, peptidoglicano (PGN), síntese peptídica em fase sólida (SPFS), Ressonância magnética nuclear (RMN), muropéptidos.

Abstract

Vancomycin is a member of the family of glycopeptide antibiotics considered as the last resort for treating infections caused by Gram-positive bacteria. In order to find new agents to combat bacterial resistance is important to understand the details of the mechanism of action of glycopeptide antibiotics. These antibiotics prevent the formation of peptidoglycan (PGN), the main component of the bacterial cell wall, which consists of a chain of alternating *N*-acetyl-glucosamine (GlucNAc) and *N*-acetyl-muramic acid (MurNAc) linked by a glycosidic bond $\beta(1\rightarrow4)$, being connected by small peptide chains.

It is well established that replacing the last amino acid in the peptide chain attached to MurNAc unit changes the interaction with glycopeptide antibiotics. So far, the interaction studies have been limited to the use of dipeptides and tripeptides *N*-protected. In order to clarify how the various compositions of the peptide and carbohydrate unit of the bacterial muropeptides affect the recognition by vancomycin, a study was developed consisting on the synthesis of a small library of peptides and muropeptides for future investigation of the molecular interactions with vancomycin.

The MurNAc unit was synthesized by two different routes involving different amino protecting groups, acetyl and allyloxycarbonyl groups. The protected MurNAc derivative **8** was obtained in 7 steps with 3% yield using as starting material GlucNAc. The peptides and muropeptides containing as terminal residue D-Ala, Gly and D-Ser, SPPS were successfully prepared by Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS).

Preliminary NMR studies of the interaction between vancomycin and MurNAc unit suggest that a possible conformational change might have occurred on vancomycin in the presence of MurNAc, and that in the future the interaction of vancomycin with the prepared muropeptides and peptides should be investigated.

Keywords: vancomycin, peptidoglycan (PGN), solid-phase peptide synthesis (SPPS), nuclear magnetic resonance (NMR), muropeptides.

Índice de abreviaturas

Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alloc	Aliloxicarbonilo
Allyl	Alilo
ARN	Ácido ribonucleico
At	7-Azabenzotriazole
Bt	Benzotriazole
c.c.	Cromatografia em coluna
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.p.	Cromatografia em camada preparativa
Cl _t	2-Clorotritilo
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
d	Dupleto
DCC	<i>N,N</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
Ddiv	(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
DOSY	<i>Diffusion-ordered spectroscopy</i>
equiv	Equivalente
F	Forte
f	Fraco
Fl	Forte largo
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonilo
ν_{\max}	Frequência máxima
GlucNAc	<i>N</i> -Acetil-glucosamina
h	Hora
HATU	Hexafluorofosfato de <i>N</i> -(dimetilamina)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridina-3-óxido
HMPB	Ácido hidroximetilmetoxifenoxibutírico

^1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LPSs	Lipopolissacarídeos
M	Médio
m	Multiplete
<i>m</i> -Dap	Ácido meso-diaminopimélico
MF	Muito forte
Mf	Muito fraco
min	Minuto
MI	Médio largo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MurNAc	Ácido <i>N</i> -acetil-murâmico
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NOE	Efeito nuclear de Overhauser
P.f.	Ponto de fusão
PAMPs	Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
PAMPs	Padrões moleculares associados a micróbios
PGN	Peptidoglicano
ppm	Partes por milhão
<i>p</i> -Ts	Toluenossufonilo
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitri(pirrolidino)-fosfónio
q	Quarteto
RMN HR-MAS	Ressonância magnético nuclear de alta resolução com rotação segundo um ângulo mágico
ROESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
s	Singuleto
SPFS	Síntese de péptidos em fase sólida
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoreto de tetrabutylamónio
TBDMS	<i>tert</i> -Butildimetilsililo
^tBu	<i>tert</i> -Butilo
TFA	Ácido trifluoroacético

TFFH	Hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio
THF	Tetrahidrofurano
Tmob	S-2,4,6-Trimetoxibenzilo
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
Tr	Trifenilmetilo
TMS	Trimetilsililo
UV	Ultravioleta
δ	Desvio químico

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Reconhecimento microbiano.....	1
1.2	Vancomicina.....	2
1.3	Abordagens sintéticas para preparação de fragmentos de PGN.....	5
1.3.1	Protecção regioselectiva da glucosamina.....	7
1.4	Princípios da síntese peptídica em fase sólida.....	9
1.4.1	Grupos protectores.....	10
1.4.2	Reagentes de activação.....	12
1.4.3	Técnicas de monitorização.....	15
1.5	Experiências de Ressonância Magnética Nuclear para o estudo de interações moleculares.....	15
2	Apresentação e discussão de resultados.....	18
2.1	Preparação do derivado de MurNAc.....	19
2.2	Unidade MurNAc via <i>N</i> -acetil-glucosamina.....	20
2.3	Preparação de um derivado de MurNAc via <i>N</i> -Alloc-glucosamina.....	25
2.4	Síntese SPFS dos péptidos.....	28
2.5	Síntese dos péptidos.....	32
2.5.1	Péptido <i>N</i> -Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (26).....	34
2.5.2	Péptido <i>N</i> -Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly (27).....	37
2.5.3	Péptido <i>N</i> -Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ser (28).....	40
2.6	Síntese dos muropéptidos.....	40
2.6.1	Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (35).....	44
2.6.2	Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly (36).....	47
2.6.3	Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ser (37).....	53
2.7	Estudos de Ressonância Magnética Nuclear.....	56
3	Conclusões e perspectivas futuras.....	59
4	Procedimento experimental.....	60
4.1	Preâmbulo.....	60
4.2	Síntese da unidade glicosídica.....	62

4.2.1	Síntese da 2-acetamido-2-deoxi-D-glucose (12).....	62
4.2.2	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranoose (14).....	62
4.2.3	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-4,6- <i>O</i> -benzilideno- α -D-glucopiranoose (11)	63
4.2.4	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3- <i>O</i> -(carboxietil)-4,6- <i>O</i> -benzilideno- α -D-glucopiranoose (15).....	64
4.2.5	Síntese da alil 2-deoxi-3- <i>O</i> -((<i>R</i>)-1'-metoxycarboniletil)-4,6- <i>O</i> -benzilidene-2-(acetil)- α -D-glucopiranoose (10)	64
4.2.6	Síntese da 2-aliloxycarbonil-2-deoxi-glucopiranoose (19)	65
4.2.7	Síntese da alil2-aliloxycarbonil-2-deoxi- α -D-glucopiranoose (18)	65
4.2.8	Síntese da alil 2-aliloxycarbonilamino-4,6- <i>O</i> -benzilideno-2-deoxi- α -D-glucopiranoose (20).....	66
4.2.9	Síntese da alil 2-aliloxycarbonilamino-4,6- <i>O</i> -benzilideno-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-1-(etoxycarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranoose (17).....	66
4.2.10	Síntese daprop-1-eno-1-iloxi 2-deoxi-3- <i>O</i> -((<i>R</i>)-1'-metoxycarboniletil)-4,6- <i>O</i> -benzilideno-2-(acetil)- α -D-glucopiranoose (16)	67
4.2.11	Síntese da prop-1-ene-1-iloxi 2-deoxi-3- <i>O</i> -((<i>R</i>)-1'-carboxietil)-4,6- <i>O</i> -benzilidene-2-(acetil)- α -D-glucopiranoose (8).....	68
4.3	Síntese dos péptidos	68
4.3.1	D-Serina-(OTBDMS)-OH (25).....	68
4.3.2	Fmoc-D-Serina-(OTBDMS)-OH (23)	69
4.4	Síntese dos péptidos	69
4.4.1	Síntese do péptido <i>N</i> -Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (26).....	69
4.4.2	Síntese do péptido <i>N</i> -Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly (27)	71
4.5	Síntese dos muropéptidos	72
4.5.1	Síntese do muropéptido 32	72
4.5.2	Síntese do muropéptido 33	74
4.5.3	Síntese do muropéptido 34	75
4.5.4	Síntese do muropéptido 36	77
5	Bibliografia.....	78
6	Anexos.....	81

6.1	Síntese da unidade MurNAc.....	81
6.2	Síntese dos péptidos e muropéptidos.....	89

Índice de figuras

Figura 1.1 Estrutura da membrana celular de uma bactéria. ⁴	1
Figura 1.2 Estrutura primária do PGN tipo L-lys (A) e tipo m-Dap (B) (adaptado de Chan-Hee Kim <i>et al.</i> , 2008). ⁵	2
Figura 1.3 Estrutura da vancomicina, antibiótico glicopeptídico aprovado para tratamento de infecções bacterianas. ⁴	3
Figura 1.4 Compostos da família do grupo da vancomicina (1) da classe de antibióticos glicopéptidicos. <i>Bahlimycin</i> (2) e <i>chloroeremomycin</i> (3), a azul encontram-se evidenciadas as alterações das estruturas tendo como base o núcleo da vancomicina característica desta família de compostos.	3
Figura 1.5 Representação do complexo formado pela vancomicina (1) e a estrutura <i>N</i> Ac ₂ -L-Lys-D-Ala-D-Ala, a azul encontram-se evidenciadas as cinco pontes de hidrogénio formadas e os átomos nelas envolvidos (adaptado de Gang Liu <i>et al.</i> , 2005). ⁸	4
Figura 1.6 Representação da interacção existente entre o dipéptido terminal da cadeia peptídica do precursor de PGN e a zona de ligação da vancomicina. Em A) o dipéptido D-Ala-D-Ala forma cinco pontes de hidrogénio e em B) o dipéptido D-Ala-D-Lac forma quatro pontes de hidrogénio. A azul encontra-se evidenciada a ponte de hidrogénio perdida (adaptado de Dudley H. Williams and Ben Bardsley). ⁶	5
Figura 1.7 Esquema de três aproximações para a síntese de PGN.	6
Figura 1.8 Representação da influência do grupo protector na posição C-2 na estereosseletividade da reacção de glicosidação (adaptado de Marques <i>et al.</i>). ¹⁵	6
Figura 1.9 Síntese de um dissacárido derivado de glucosamina por um processo <i>one-pot</i> (adaptado de Marques <i>et al.</i>). ¹⁷	7
Figura 1.10 Síntese de um dissacárido derivado de glucosamina e de um muropéptido (adaptado de Marques <i>et al.</i>). ¹⁷	7
Figura 1.11 Exemplos de grupos protectores utilizados na funcionalidade amina da glucosamida.	8
Figura 1.12 Estrutura genérica do ião aciloxonio.	8
Figura 1.13 Exemplo de grupos protectores utilizados para os diversos grupos hidroxilos presentes na glucosamina.	9
Figura 1.14 Representação do ciclo de (SPFS) pelo método de Sheppard.	10
Figura 1.15 Estrutura do Fmoc, 4 .	11
Figura 1.16 Estruturas do HOBt, (5) e do HOAt, (6).	14
Figura 1.17 Figura ilustrativa do efeito da experiência de DOSY, a azul observa-se os ligandos e a vermelho observa-se os ligandos acoplados aos receptores (adaptado de Jiménez-Barbero <i>et al.</i>). ³⁵	16
Figura 2.1 Estrutura dos muropéptidos pretendidos.	18

Figura 2.2 A) Estrutura do <i>linker</i> da resina HMPB-MBHA. B) Aminoácido genérico ligado por uma ligação éster ao hidroxilo de ligação representando a ligação formada na construção do péptido pelo método SPFS. C) Estrutura do <i>linker</i> da resina HMPB-AM.	29
Figura 2.3 Ciclo utilizado de SPFS esquematizado para os péptidos 9	30
Figura 2.4 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 26	34
Figura 2.5 Correlações existentes nas experiências de COSY (azul), TOCSY (verde) e NOESY (rosa) num dipéptido exemplo, D-Ala-D-Ala.	35
Figura 2.6 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do péptido 26	35
Figura 2.7 Sobreposição dos espectros de TOCSY (azul) e NOESY (vermelho) do péptido 26	36
Figura 2.8 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 27	37
Figura 2.9 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do péptido 27	38
Figura 2.10 Sobreposição dos espectros de TOCSY (azul) e NOESY (rosa) do péptido 27	38
Figura 2.11 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 28	40
Figura 2.12 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 32	44
Figura 2.13 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 32	45
Figura 2.14 Espectros de TOCSY (azul) do muropéptido 32	46
Figura 2.15 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 33	47
Figura 2.16 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 33	48
Figura 2.17 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 33	49
Figura 2.18 Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido 36	50
Figura 2.19 Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido 36	51
Figura 2.20 Sobreposição dos espectros de NOESY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido 36	51
Figura 2.21 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 34	53
Figura 2.22 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 34	54
Figura 2.23 Sobreposição dos espectros de TOCYS do muropéptido 34 (azul) e TOCYS do muropéptido 32 (vermelho).....	55
Figura 2.24 Representação de uma expansão de 9,6 a 3,0ppm dos espectros de ¹ H-RMN da vancomicina (azul), MurNAc desprotegido (verde) e de uma mistura 1:1,5 das soluções a 2mM de vancomicina/MurNAc (vermelho).....	56
Figura 2.25 Sobreposição dos espectros de ROESY da vancomicina (azul/verde) e do ROESY da mistura (rosa/vermelho).	58
Figura 6.1 Espectro de IV do composto 15	81
Figura 6.2 Espectro de ¹ H-RMN do composto 15	81
Figura 6.3 Espectro de ¹³ C-RMN do composto 15	82
Figura 6.4 Espectro de IV do composto 10	82
Figura 6.5 Espectro de ¹ H-RMN do composto 10	83

Figura 6.6 Espectro de IV do composto 19	83
Figura 6.7 Espectro de ^1H -RMN do composto 19	84
Figura 6.8 Espectro de IV do composto 18	84
Figura 6.9 Espectro de ^1H -RMN do composto 18	85
Figura 6.10 Espectro de IV do composto 18	85
Figura 6.11 Espectro de ^1H -RMN do composto 20	86
Figura 6.12 Espectro de ^1H -RMN do composto 17	86
Figura 6.13 Espectro de ^1H -RMN do composto 16	87
Figura 6.14 Espectro de ^1H -RMN do composto 18	87
Figura 6.15 Espectro de IV do composto 23	88
Figura 6.16 Espectro de ^1H -RMN do composto 23	88
Figura 6.17 Espectro de ^1H -RMN do composto 26	89
Figura 6.18 Espectro de COSY do composto 26	89
Figura 6.19 Espectro de TOCSY do composto 26	90
Figura 6.20 Espectro de NOESY do composto 26	90
Figura 6.21 Espectro de ^1H -RMN do composto 27	91
Figura 6.22 Espectro de COSY do composto 27	91
Figura 6.23 Espectro de TOCSY do composto 27	92
Figura 6.24 Espectro de NOESY do composto 27	92
Figura 6.25 Espectro de ^1H -RMN do composto 32	93
Figura 6.26 Espectro de COSY do composto 32	93
Figura 6.27 Espectro de TOCSY do composto 32	94
Figura 6.28 Espectro de NOESY do composto 32	94
Figura 6.29 Espectro de ^1H -RMN do composto 33	95
Figura 6.30 Espectro de COSY do composto 33	95
Figura 6.31 Espectro de TOCSY do composto 33	96
Figura 6.32 Espectro de NOESY do composto 33	96
Figura 6.33 Espectro de ^1H -RMN do composto 34	97
Figura 6.34 Espectro de COSY do composto 34	97
Figura 6.35 Espectro de TOCSY do composto 34	98
Figura 6.36 Espectro de ^1H -RMN do composto 36	98
Figura 6.37 Espectro de COSY do composto 34	99
Figura 6.38 Espectro de TOCSY do composto 36	99
Figura 6.39 Espectro de NOESY do composto 36	100
Figura 6.40 Espectro de ^1H -RMN do composto 38	100

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Exemplos de grupos protectores mais comuns da cadeia lateral dos aminoácidos utilizada no método de Sheppard. ²¹	12
Tabela 1.2 Métodos de acoplamento mais usados no método de Sheppard.	13
Tabela 2.1 Dados espectroscópicos de IV (em cm ⁻¹) e ¹ H-RMN (em ppm) dos produtos obtidos na síntese da unidade MurNAc via <i>N</i> -acetil-glucosamina.	23
Tabela 2.2 Dados espectroscópicos de IV (em cm ⁻¹) e ¹ H-RMN (em ppm) dos produtos obtidos na síntese da unidade MurNAc via <i>N</i> -alloc-glucosamina.	27
Tabela 2.3 Grupos protectores do grupo hidroxilo da serina pelo método de Sheppard. ²¹	31
Tabela 2.4 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do péptido 26	36
Tabela 2.5 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do péptido 27	39
Tabela 2.6 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do muropéptido 32	46
Tabela 2.7 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do muropéptido 33	49
Tabela 2.8 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do muropéptido 33 e do muropéptido 36	52
Tabela 2.9 Desvios químicos observados no espectro ¹ H-RMN do muropéptido 34	55
Tabela 2.10 Tabela resumo com os sinais de ¹ H-RMN que sofreram alteração do desvio químico entre a sua forma pura e o quando em mistura.	57

Índice de esquemas

Esquema 1.1 Mecanismo de remoção do grupo Fmoc.....	11
Esquema 1.2 Reacção de acoplamento genérico entre dois aminoácidos estando um dos aminoácidos acoplado a uma resina.	13
Esquema 1.3 Mecanismo proposto no acoplamento com a presença do reagente HOAt a preto e a azul encontram-se representados dois aminoácidos figurativos que reagem.	14
Esquema 2.1 Análise retrossintética dos muropéptidos 7a (terminal D-Ala), 7b (terminal Gly) e 7c (terminal D-Ser).	19
Esquema 2.2 Plano retrossintético segundo a estratégia via <i>N</i> -acetil-glucosamina.	20
Esquema 2.3 Síntese do derivado de <i>N</i> -acetil-glucosamina, composto 14	20
Esquema 2.4 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 14	21
Esquema 2.5 Síntese do composto 15	21
Esquema 2.6 Síntese do composto 10	21
Esquema 2.7 Síntese do composto 16	22
Esquema 2.8 Representação do produto <i>cis</i> e do produto <i>trans</i> obtido na isomerização e as respectivas constantes de acoplamento.	22
Esquema 2.9 Síntese do composto 8	23
Esquema 2.10 Plano retrossintético segundo a estratégia de síntese da <i>N</i> -alloc-glucosamina.....	25
Esquema 2.11 Síntese do derivado de <i>N</i> -alloc-glucosamina 18	26
Esquema 2.12 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 18 baseado no trabalho de Fraser-Reid <i>et al.</i> ¹⁹	26
Esquema 2.13 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 20	26
Esquema 2.14 Estratégia de síntese para obtenção do composto 21	27
Esquema 2.15 Esquema simplificado da estratégia de síntese dos péptidos: 9a (terminal D-Ala), 9b (terminal Gly) e 9c (terminal D-Ser).....	29
Esquema 2.16 Mecanismo proposto para a activação de um aminoácido com os reagentes PyBOP, HOBt e DIPEA.	30
Esquema 2.17 Processos de obtenção do produto 24 . Em A) protecção directa do hidroxilo do material de partida Fmoc-D-Ser-OH e em B) utilizando de D-Ser-OH como material de partida compreendendo dois passos.	32
Esquema 2.18 Síntese dos péptidos com o terminal: D-Ala (26), Gly (27) e D-Ser (28) com acetilação do grupo amina, desprotecção da L-Lys, D-Ser e clivagem da resina. Condições reaccionais i) 1. DMAP, anidrido acético, DMF, t.a., <i>overnight</i> , 2. 2% hidrazina em DMF (10 x 1mL, 10min); ii) 0,1M TBAF em DMF (5 x 1mL, 5min); iii) 2% TFA em DMF (11 x 1mL).	33
Esquema 2.19 Esquema sintético utilizado na síntese do composto 30	41

Esquema 2.20 Síntese do composto 31 via pelo acoplamento do composto 30 com 9 seguido de remoção do grupo Ddiv da cadeia lateral da L-Lys.	41
Esquema 2.21 Síntese dos muropéptidos com o terminal: D-Ala (32), Gly (33) e D-Ser (34) a partir do composto 31 . As condições reaccionais: i) 2% TFA em DCM (11 x 1mL) e ii) 0,1M TBAF em DMF, (5 x 1mL) (5 x 5min).	42
Esquema 2.22 Esquema de síntese dos muropéptidos hidrogenados D-Ala (35), Gly (36) e D-Ser (37).	43

1 Introdução

1.1 Reconhecimento microbiano

Actualmente vivemos num mundo em que o contacto com microorganismos é constante, seja bactérias, fungos, parasitas ou vírus. Os organismos, particularmente o humano, têm um complexo sistema de defesa, um conjunto de barreiras que visam impedir a entrada de agentes patogénicos. Quando este é comprometido ocorre a activação de um mecanismo inato (sistema imunitário inato) que reconhece e inicia a resposta contra o ataque por parte de microorganismos patogénicos.¹

O sistema imunitário inato reconhece estruturas moleculares altamente conservadas, associadas a microorganismos que provocam respostas imunes inatas como a resposta inflamatória. Os padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PMAPs) são moléculas associadas a agentes patogénicos, que são reconhecidas pelas células do sistema imune inato, e incluem os lipopolissacarídeos (LPSs) e peptidoglicanos (PGNs) no caso de bactérias e o 1,3- β -D-glucano para os fungos. Contudo esta designação de PMAPs tem alguma controvérsia pois os agentes não patogénicos também sintetizam algumas destas moléculas, havendo a designação de padrões moleculares associadas a micróbios (PMAMs) como sendo a designação mais apropriada.^{2, 3}

O PGN é o constituinte maioritário da parede celular bacteriana, constituído por cadeias lineares em que a unidade repetida consiste em moléculas de *N*-acetil-glucosamina (GlucNAc) e ácido *N*-acetil-murâmico (MurNAc) ligadas por uma ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$. À unidade MurNAc encontra-se ligada uma cadeia pentapeptídica que permite a ligação entre as cadeias de carboidrato por um *cross-link* de pequenas cadeias peptídicas (Figura 1.1). Devido a esta estrutura o PGN é considerado um polímero que confere suporte e resistência às alterações de pressão osmótica.

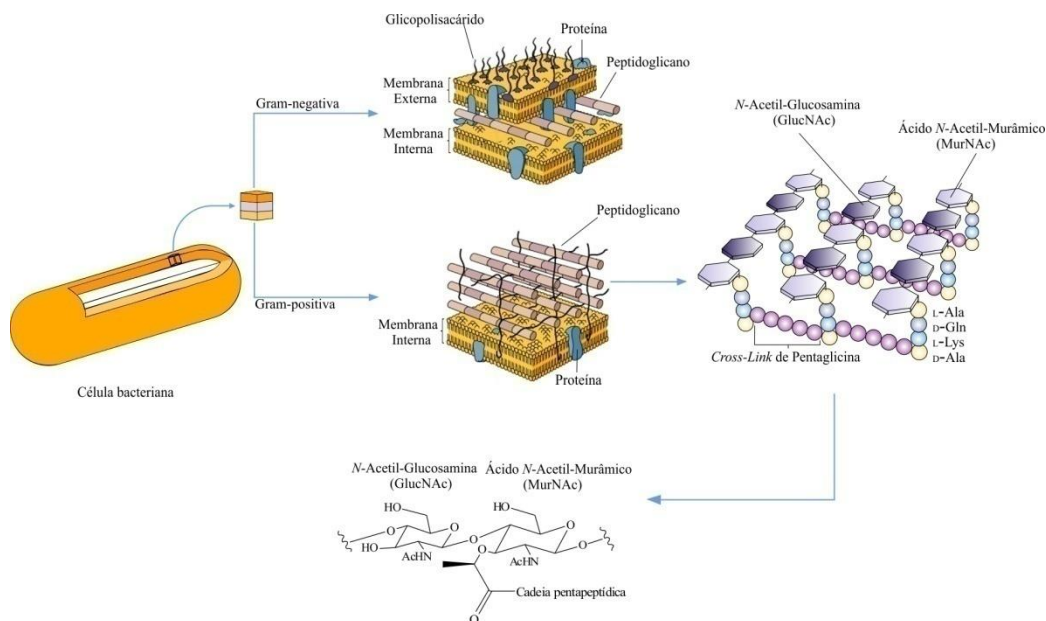


Figura 1.1 Estrutura da membrana celular de uma bactéria.⁴

Apesar de estar presente nas bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas o PGN apresenta algumas diferenças. No caso das bactérias Gram-positivas a cadeia peptídica ligada à unidade MurNAc tem como terceiro aminoácido a L-Lys (Figura 1.2-A), no caso das bactérias Gram-negativas o PGN a cadeia peptídica ligada a unidade MurNAc tem como terceiro resíduo o ácido meso-diaminopimélico (*m*-Dap) (Figura 1.2-B).^{4, 5}

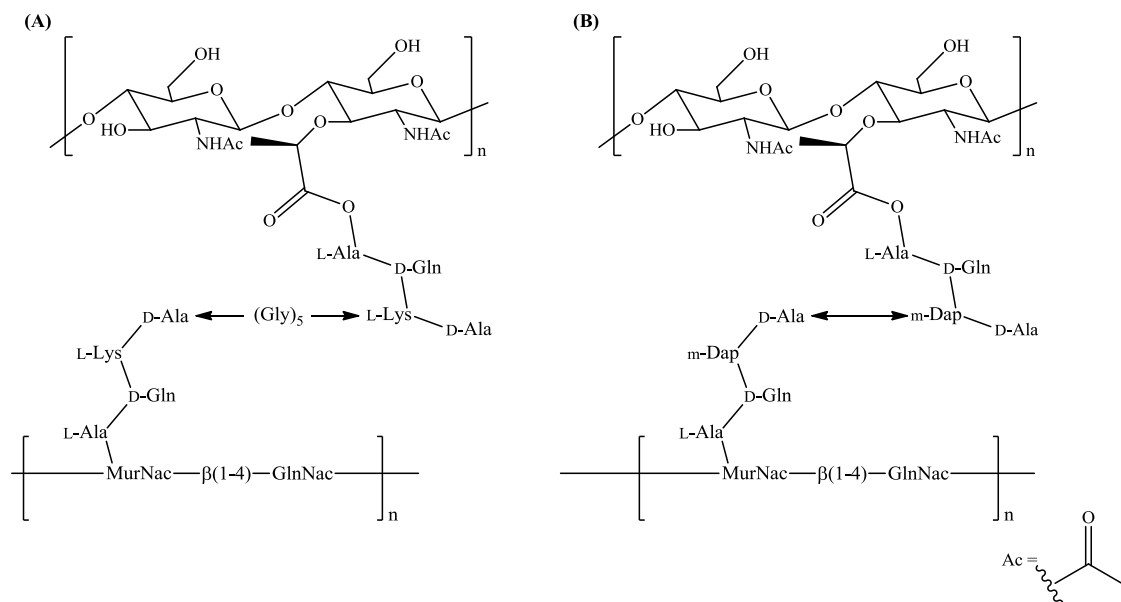


Figura 1.2 Estrutura primária do PGN tipo L-lys (A) e tipo *m*-Dap (B) (adaptado de Chan-Hee Kim *et al.*, 2008).⁵

Devido ao facto de o PGN ser um dos componentes da parede celular e um dos PMAMs, tem sido utilizado como alvo terapêutico, em casos de infecções por parte destes microorganismos. Para tal, ao longo do tempo têm sido estudados vários antibióticos para combater este tipo de infecções.

1.2 Vancomicina

O ano de 1935 foi marcante para a criação de uma terapia química contra infecções bacterianas sistémicas. Foi nesse ano que se descobriu o primeiro composto com propriedades antibacterianas, a *p*-aminobenzeno sulfonamida. Posteriormente, em 1940s, a penicilina começou a ser administrada também com fins antibacterianos.¹

Actualmente existem várias classes de antibacterianos classificados consoante a natureza dos alvos biológicos, como por exemplo o bloqueio da biossíntese da parede bacteriana, de proteínas bacterianas ou de ácidos desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). Um outro ponto de diferenciação é a origem do antibiótico, se são de origens naturais ou sintéticos.⁴

Na classe de antibióticos glicopeptídicos encontra-se a vancomicina (Figura 1.3, (1)). Esta foi isolada pela primeira vez, na década de 1950 por uma empresa farmacêutica americana Eli Lilly a partir de uma amostra de solo. Sendo produzida pela bactéria *Amycolatopsis orientalis* usada desde 1959 para tratamentos clínicos.⁶

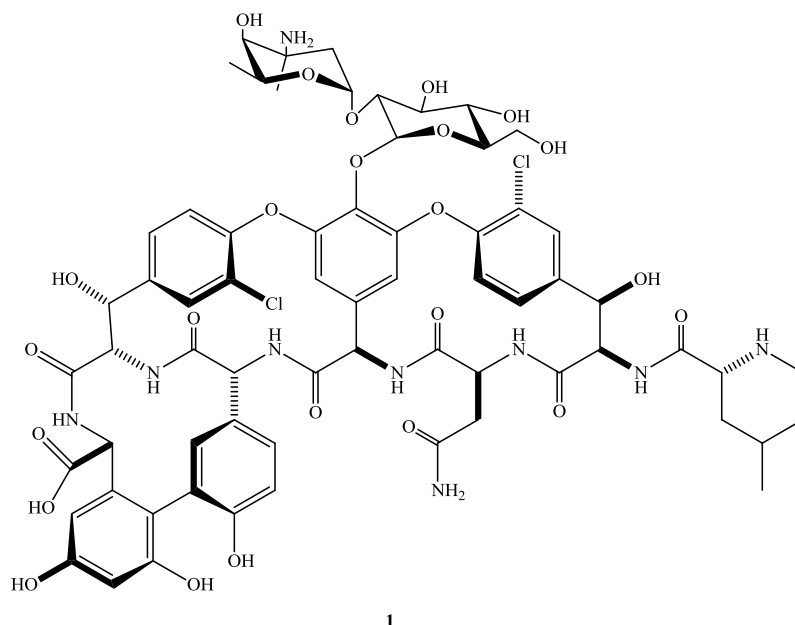


Figura 1.3 Estrutura da vancomicina, antibiótico glicopeptídico aprovado para tratamento de infecções bacterianas.⁴

Vários compostos derivados da vancomicina têm sido isolados a partir da estirpe de *actinomicetas*. Compostos como *bahlimycin* (2) e *chloroeremomycin* (3) têm ambos o núcleo heptapeptídico da família da vancomicina (Figura 1.4 (A) e (B) respectivamente). A *bahlimycin* (2) difere por ter um derivado 4-oxovancosamina no resíduo 6, e pela ausência do dissacárido ligado ao anel aromático central. Quanto à *chloroeremomycin* (3) difere no terminal de hexose 2,3,6-tridesoxi-3-amino-3-metil, visto que o grupo OH em posição 4 da trideoxi-hexose encontra-se em posição equatorial ao invés do existente na unidade de vancosamina da vancomicina (1) que se encontra em posição axial.⁴

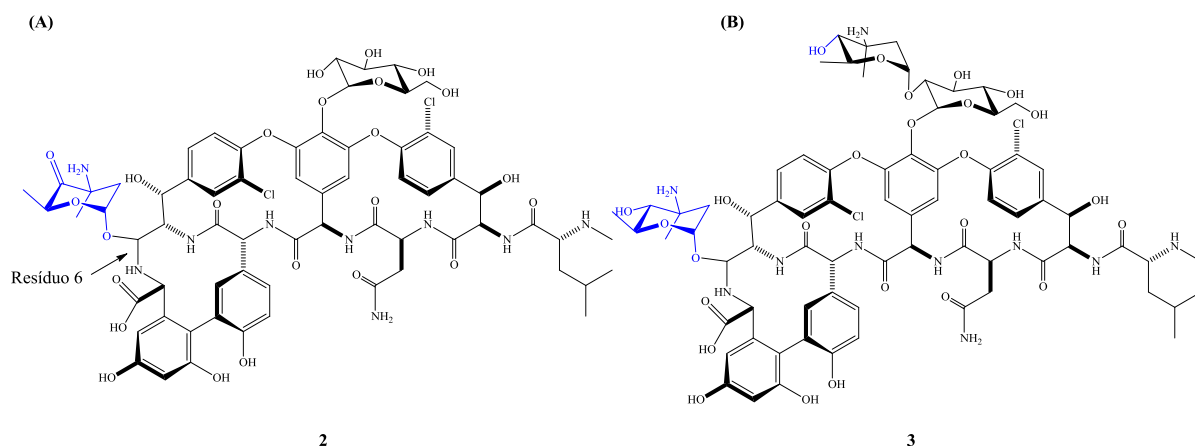


Figura 1.4 Compostos da família do grupo da vancomicina (1) da classe de antibióticos glicopeptídicos. *Bahlimycin* (2) e *chloroeremomycin* (3), a azul encontram-se evidenciadas as alterações das estruturas tendo como base o núcleo da vancomicina característica desta família de compostos.

A vancomicina é um antibiótico e pertence a uma família de antibióticos glicopeptídicos usados no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas como último recurso, nomeadamente as estirpes *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Os estudos efectuados até à data têm demonstrado que esta família de antibióticos actua ligando-se de forma não covalente à cadeia pentapeptídica da unidade MurNAc da parede bacteriana, mais propriamente ao seu terminal da

cadeia peptídica, D-Ala-D-Ala, impedindo que a transpeptidase complete o *cross-link* entre as diferentes cadeias (Figura 1.5). Desta forma a parede celular fica comprometida e susceptível à lise celular provocada por alterações de pressão osmótica.⁷

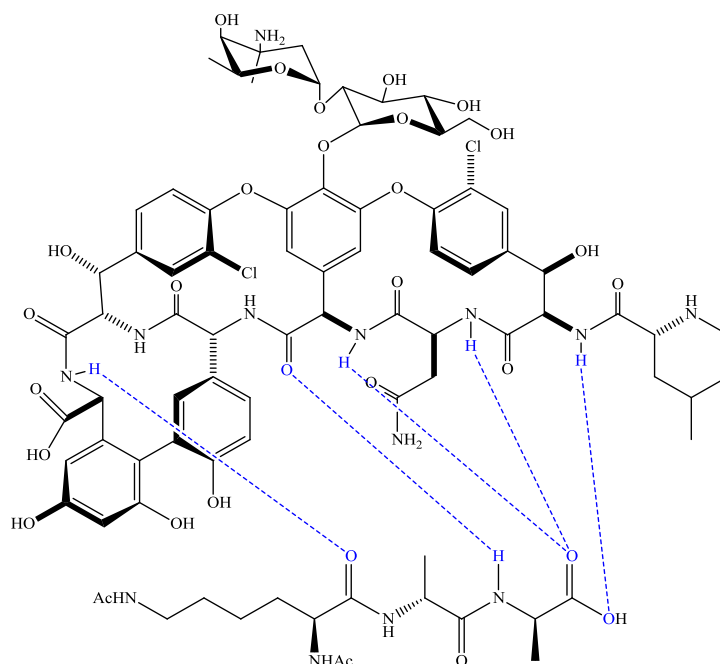


Figura 1.5 Representação do complexo formado pela vancomicina (1) e a estrutura $\text{NAc}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$, a azul encontram-se evidenciadas as cinco pontes de hidrogénio formadas e os átomos nelas envolvidos (adaptado de Gang Liu *et al.*, 2005).⁸

Nas últimas décadas tem-se verificado um aumento dos casos de infecção por parte de bactérias MRSA, principalmente em ambiente hospitalar. Um dos mecanismos de resistência das bactérias resulta da alteração do último aminoácido da cadeia peptídica do PGN. Esta alteração interfere nas interações da vancomicina com o terminal peptídico da cadeia MurNAc.⁹

De modo a evitarem a acção da vancomicina as bactérias MRSA alteraram o terminal do precursor do PGN de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac. Esta alteração ocorre com substituição de uma das pontes de hidrogénio, que ocorre normalmente pelo grupo carbonilo da vancomicina com o grupo amida do terminal da última alanina dos precursores, por uma interacção repulsiva com o oxigénio do lactato terminal (Figura 1.5 e Figura 1.6).^{6, 9} Actualmente existem também evidências da alteração do terminal do precursor do PGN de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Ser, não existindo no entanto estudos estruturais que justifiquem a resistência para esta alteração estrutural.¹⁰

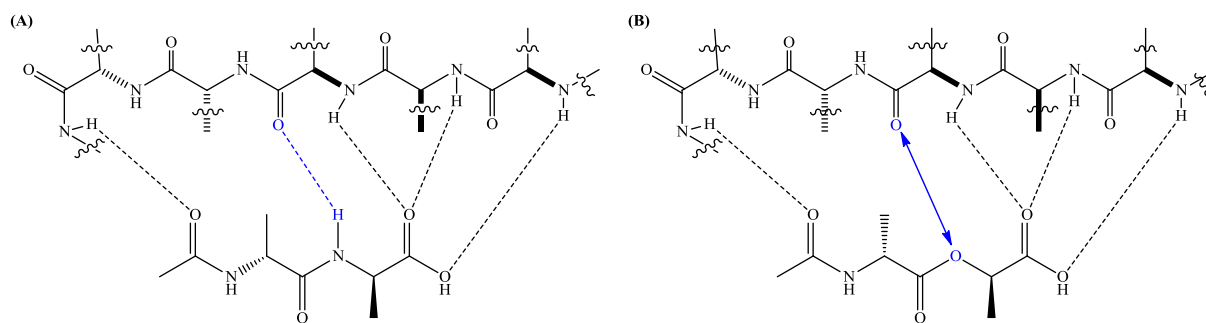


Figura 1.6 Representação da interacção existente entre o dipéptido terminal da cadeia peptídica do precursor de PGN e a zona de ligação da vancomicina. Em A) o dipéptido D-Ala-D-Ala forma cinco pontes de hidrogénio e em B) o dipéptido D-Ala-D-Lac forma quatro pontes de hidrogénio. A azul encontra-se evidenciada a ponte de hidrogénio perdida (adaptado de Dudley H. Williams and Ben Bardsley).⁶

Devido a esta tendência de adaptação das bactérias torna-se importante compreender o mecanismo de reconhecimento molecular, por parte da vancomicina (**1**) aos diversos precursores modificados de PGN, de modo a ajustar a diversificação estrutural dos antibióticos e otimizar a sua utilização e eficácia. Por esta razão a comunidade científica tem desenvolvido esforços para obter fragmentos de PGN sintéticos para estudos biológicos.

1.3 Abordagens sintéticas para preparação de fragmentos de PGN

O PGN é um glicoconjugado, como já referido no Capítulo 1.1, constituído por uma região glicosídica e uma região peptídica. Devido ao seu papel como PMAMs tem suscitado um grande interesse.

A partir da década de 80 começou-se a verificar um elevado interesse na síntese da unidade de PGN.¹¹ Este interesse foi despoletado pela descoberta da associação do PGN a infecções bacterianas e resistência a antibióticos. O PGN, e o reconhecimento do PGN por parte de receptores pelos quais ocorre este reconhecimento ainda não estão perfeitamente entendidos, o que leva à necessidade do desenvolvimento da sua síntese.

Várias estratégias têm sido abordadas ao longo dos anos para a síntese de fragmentos de PGN. Na generalidade das estratégias já existentes estas envolvem uma síntese sequencial com múltiplas etapas, sendo a mais longa de 37 passos proposta por Mobashery *et al.*¹² Esta via envolve vários passos de protecção e desprotecção. Outras como a proposta por Walker *et al.*,¹³ com 22 passos ou ainda a estratégia proposta por Fukase *et al.*,¹⁴ com 21 passos permitem a síntese de fragmentos de PGN (Figura 1.7).

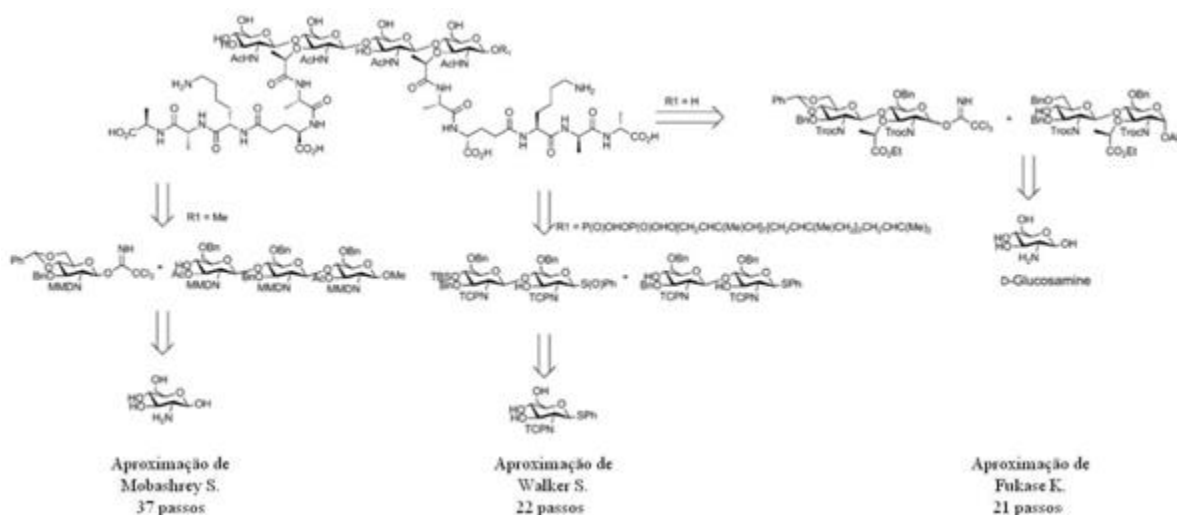


Figura 1.7 Esquema de três aproximações para a síntese de PGN.

Dois factores comuns nestes processos são: o recurso a derivados de *N*-acetil-glucosamina como materiais de partida e um dos passos mais problemáticos em todas as propostas é o passo de glicosidação. Este facto deve-se à baixa reactividade do grupo 4-hidroxilo na formação da ligação $\beta(1\rightarrow4)$ devido a impedimento estereo. Apesar do recurso à *N*-acetil-glucosamina como material de partida esta apresenta várias limitações sintéticas para a preparação de oligossacáridos, pois o grupo acetilo pode formar pontes de hidrogénio dificultando a reacção de glicosidação.

A glicosidação entre a unidade do doador e do aceitador, contendo a funcionalidade de 2-acetamido-2-deoxi geralmente é impraticável, devido à formação de um intermediário estável 1,2-*O*-*N*-oxazolina durante glicosidação (Esquema 1.8 A), o que diminui significativamente o rendimento da glicosidação. Uma estratégia para evitar a formação deste intermediário estável consiste na utilização de doadores com grupos protectores do grupo amina dissustituídos (Esquema 1.8 B), bloqueando o grupo amina.¹⁵

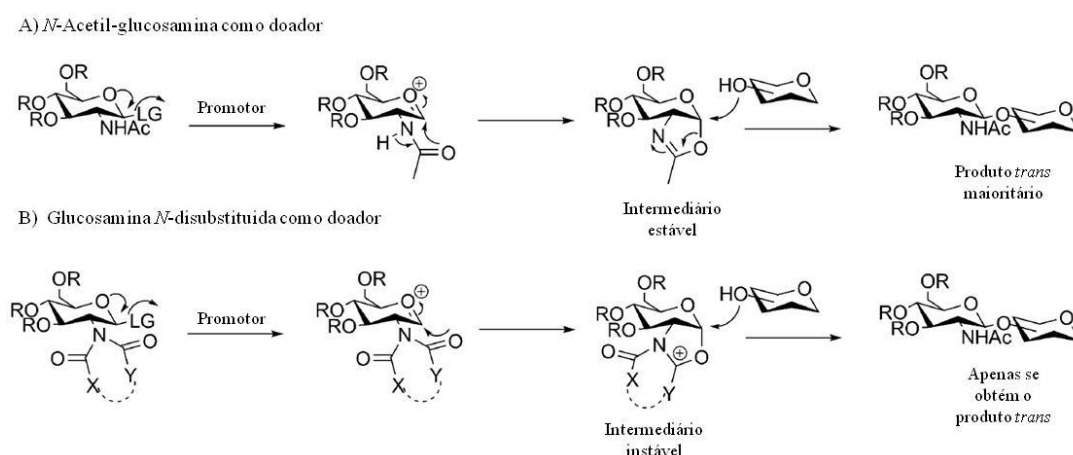


Figura 1.8 Representação da influência do grupo protector na posição C-2 na estereosseletividade da reacção de glicosidação (adaptado de Marques *et al.*).¹⁵

A nossa equipa também se tem debruçado sobre este tema, no desenvolvimento de protecção regioselectiva *one-pot* da glucosamina (Esquema 1.9).¹⁶

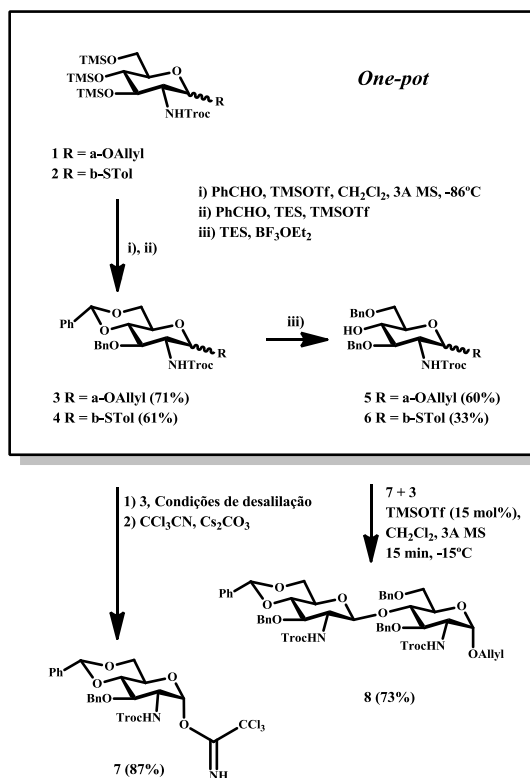


Figura 1.9 Síntese de um dissacárido derivado de glucosamina por um processo *one-pot* (adaptado de Marques *et al.*).¹⁷

O nosso grupo tem igualmente desenvolvido estratégias de síntese ortogonal para preparação de fragmentos de PGN para posteriores estudos biológicos e de interação (Esquema 1.10).^{18, 17}

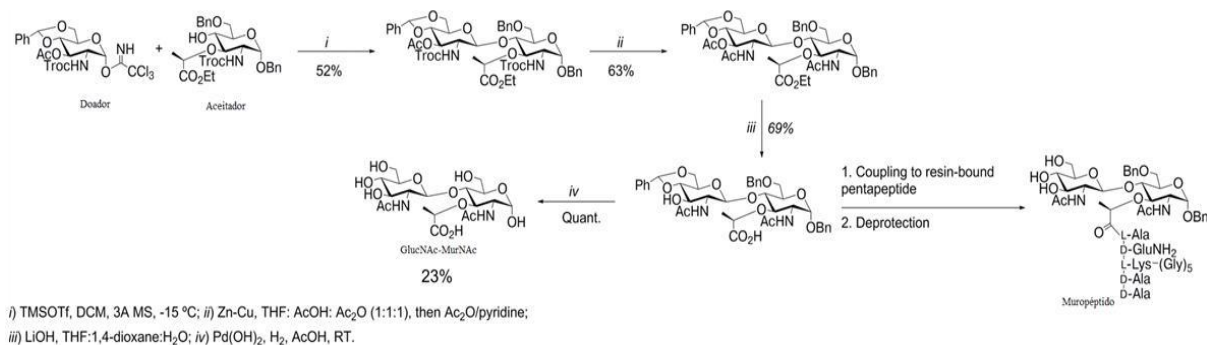


Figura 1.10 Síntese de um dissacárido derivado de glucosamina e de um muropéptido (adaptado de Marques *et al*).¹⁷

1.3.1 Protecção regioselectiva da glucosamina

A síntese de oligosacáridos, glicoconjugados, glicolípidos e glicoproteínas em particular os que envolvem a unidade de glucosamina tem atraído o interesse da comunidade científica.¹⁹ A síntese de derivados da glucosamina tem sido desenvolvida tendo em conta a regio- e estereoselectividade. Para tal recorre-se frequentemente a estratégias de protecção/desprotecção das diversas funcionalidades que a sua estrutura apresenta, grupos hidroxilo primários e secundários e um grupo amina.²⁰

A unidade MurNAc existente na composição do PGN, pode ser preparada a partir da glucosamina e foi preparada neste trabalho. Para obtenção desta unidade tão relevante sob o ponto de vista biológico, a síntese de unidades MurNAc segue geralmente uma estratégia ortogonal de protecção dos grupos existentes da glucosamina.¹⁹

Existem actualmente vários grupos protectores para a funcionalidade do grupo amina da glucosamina, tais como: o grupo acetilo (Ac) (Figura 1.11 A); aliloxycarbonilo (Alloc) (Figura 1.11 B); 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (Figura 1.11 C); trifluoracetilo (Figura 1.11 D); azida (Figura 1.11 E) e Ftalimido (Figura 1.11 F).^{15, 19}

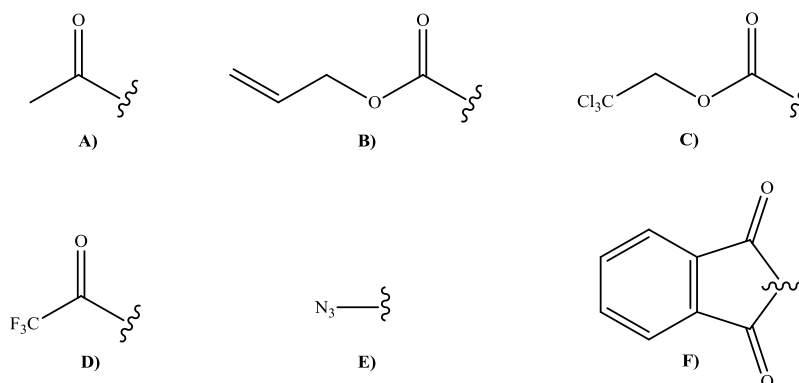


Figura 1.11 Exemplos de grupos protectores utilizados na funcionalidade amina da glucosamida.

O grupo protector do grupo amina da glucosamina interfere na estereoselectividade da reacção de glicosidação aquando da preparação de oligossacaridos. Se está presente um grupo amida ou um grupo carbamato, ocorre a formação do glicósido 1,2-*trans* devido à participação deste grupo vizinho através da formação de um ião aciloxonio reactivo (Figura 1.12), dirigindo o ataque, essencialmente para a face de topo do anel. Por outro lado se o grupo presente na posição C-2 não participa nessa formação obtêm-se o dissacarido 1,2-*cis*, de qualquer forma a presença desse grupo não participante não é suficiente para garantir a selectividade *cis*.¹⁵

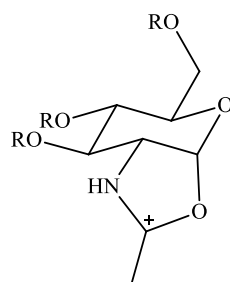


Figura 1.12 Estrutura genérica do ião aciloxonio.

Esta participação, do grupo vizinho, grupo protector do grupo amina da glucosamina, ocorre não só em reacções de glicosidação mas também em reacções de ataque nucleofílico à posição anomérica.

Para além da protecção do grupo amina presente na glucosamina também se tem desenvolvido vários procedimentos para a protecção regiosselectiva dos vários grupos hidroxilo presentes. Existe uma variedade de grupos funcionais que se podem utilizar encontrando-se na Figura 1.13 alguns exemplos.

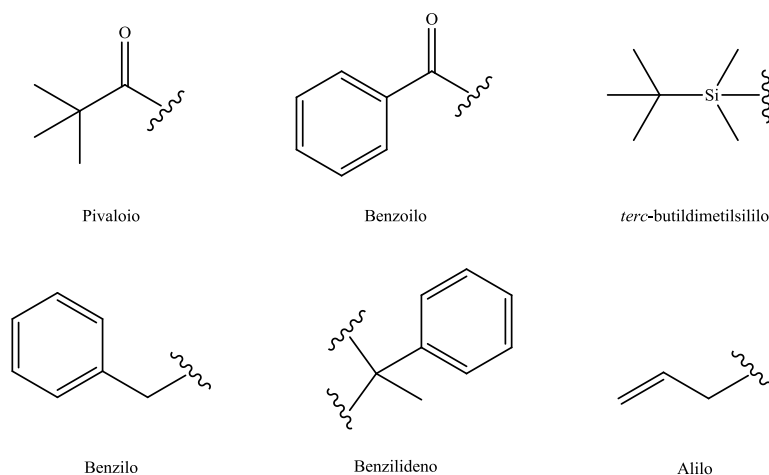


Figura 1.13 Exemplo de grupos protectores utilizados para os diversos grupos hidroxilos presentes na glucosamina.

A síntese da unidade MurNAc leva à necessidade de utilização de grupos protectores que apresentem estabilidade em diversas condições reaccionais, em particular aquando da introdução do grupo lactilo em *O*-3, sendo clivados de forma selectiva, em condições suaves e cuja inserção ou clivagem não interfira com os restantes grupos.²¹

1.4 Princípios da síntese peptídica em fase sólida

A síntese de péptidos em fase sólida (SPFS) tem progredido consideravelmente existindo uma contínua adaptação do método a novas necessidades. O método de SPFS apresenta a vantagem de uma menor necessidade de processos de purificação pois uma simples filtração e lavagem permitem passar para a reacção seguinte. A molécula-alvo encontra-se ligada covalentemente a um suporte sólido, uma resina insolúvel permitindo com o ajuste das quantidades de reagentes, normalmente em excesso levando a que a reacção seja completa.²¹

Apesar de se apresentar como uma alternativa mais verde e simples em relação à síntese em solução, o método SPFS tem algumas desvantagens, como por exemplo problemas associados ao *loading* de resina, impedimento estereoquímico que pode ocorrer devido aos grupos protectores presentes nos aminoácidos ou do próprio crescimento da cadeia. Dois outros problemas associados à utilização deste método são o facto de se verificar acumulação de impurezas ou produtos laterais que dificultam a purificação posterior.²¹

A SPFS foi descrita por Merrifield em 1963, levando-o a ganhar o prémio Nobel da Química em 1984. Este protocolo descrito por Merrifield foi utilizado durante muito tempo no entanto, este apresentava algumas limitações na preparação de sequências peptídicas mais complexas, o que levou ao desenvolvimento deste método.^{22, 23}

Uma adaptação do método proposto por Sheppard em 1978 conhecida por método de Sheppard ou método de *N*-Fmoc/^tBu baseia-se numa estratégia de protecção ortogonal onde existe o recurso a grupos protectores permanentes e temporários que apresentam condições de clivagem diferentes.²⁴ Este método leva à construção do péptido por um ciclo repetido por cada aminoácido inserido de forma sequencial, o ciclo compreende seis passos gerais (Figura 1.14):

1. Desprotecção da resina no caso desta se apresentar protegida;
2. Introdução do aminoácido pré-activado;
3. Lavagem e filtração para remoção do excesso de reagentes utilizados;
4. Desprotecção do aminoácido, neste método será a remoção do grupo Fmoc;
5. Repetição dos passos 2 a 4 de forma sequencial até construir a cadeia pretendida;
6. Desprotecção dos grupos protectores permanentes e clivagem do péptido da resina.

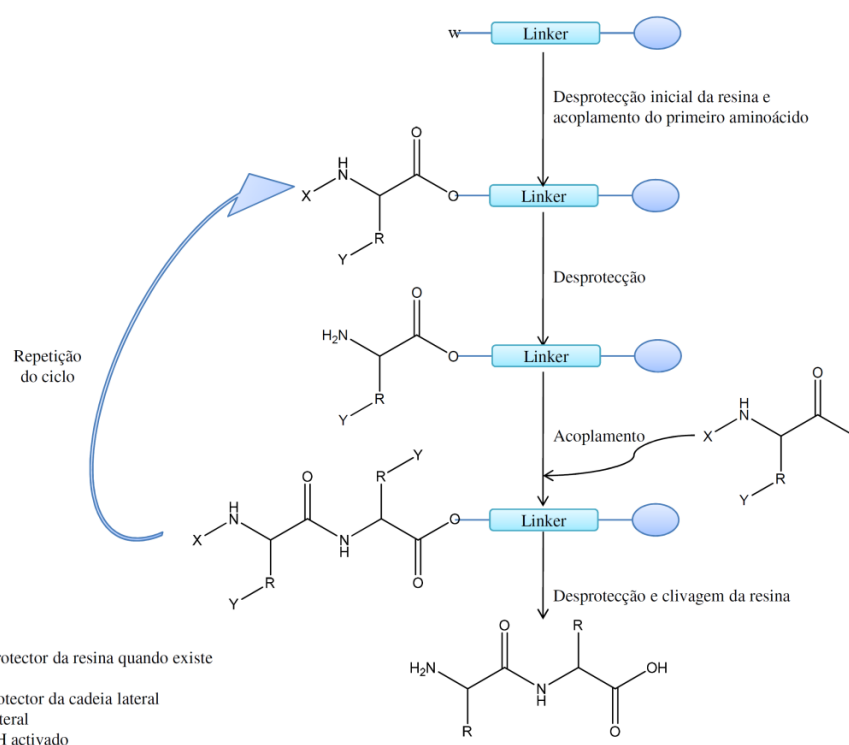


Figura 1.14 Representação do ciclo de (SPFS) pelo método de Sheppard.

1.4.1 Grupos protectores

O grupo protector temporário utilizado no método de Sheppard é o grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc, Figura 1.15 (4)). Este grupo é bastante lábil em condições básicas e por esta razão é utilizado para protecção ao grupo α -amino do terminal do aminoácido.²¹

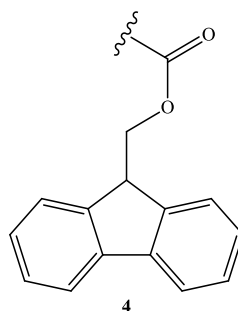
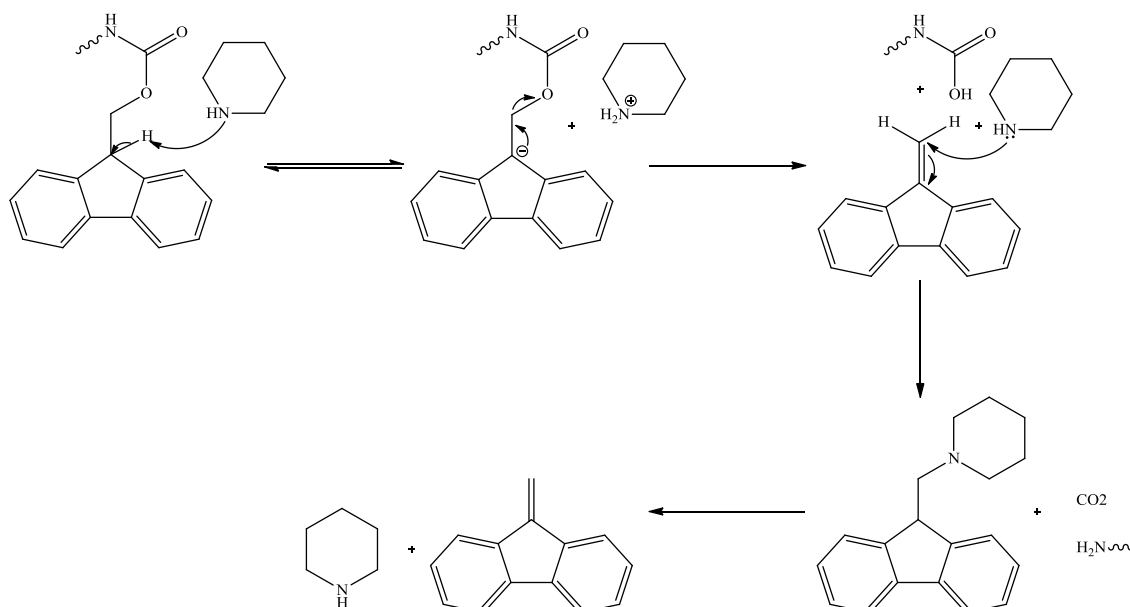


Figura 1.15 Estrutura do Fmoc, 4.

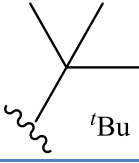

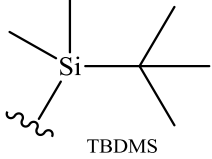
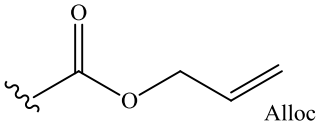
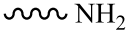
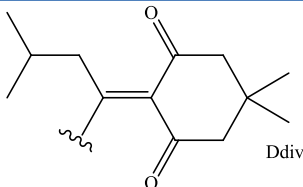
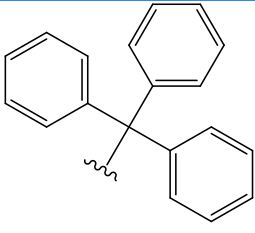
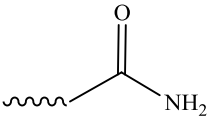
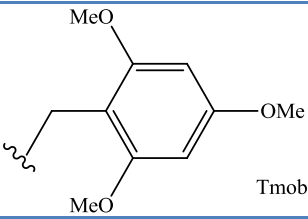
A remoção deste grupo pode ser feita em condições mais suaves comparativamente a outros grupos, mais concretamente com tratamento de 20 a 50 % de piperidina em DMF, sendo esta uma das maiores vantagens do método de Sheppard. O mecanismo de desprotecção do grupo Fmoc, Esquema 1.1, tem como passo chave a eliminação do anel de fluoreno que gera o intermediário do tipo aromático ciclopentadieno. Este produto absorve fortemente no ultravioleta (UV) tendo assim um grande potencial de monitorização da reacção.²¹



Esquema 1.1 Mecanismo de remoção do grupo Fmoc.

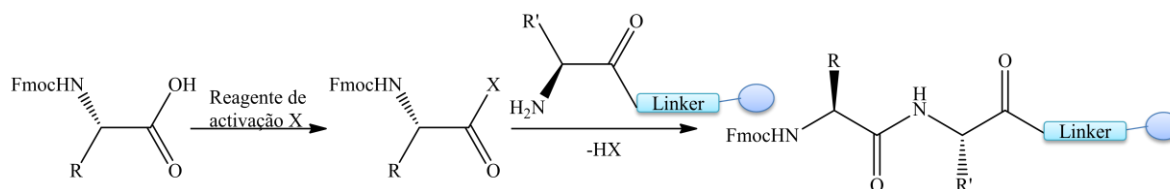
Os grupos permanentes utilizados para a protecção das cadeias laterais dos aminoácidos, que contêm grupos funcionais e podem interferir na síntese, são normalmente clivados por condições ácidas, não sendo afectados pelas condições de acoplamento e permitindo que os grupos sejam removidos no passo final da síntese no momento da clivagem do péptido da resina. Na Tabela 1.1 encontram-se exemplos de vários grupos protectores e condições de clivagens gerais.²¹

Tabela 1.1 Exemplos de grupos protectores mais comuns da cadeia lateral dos aminoácidos utilizada no método de Sheppard.²¹

Cadeia lateral do aminoácido	Grupo protector	Condições de clivagem
Serina (Ser) / Treonina (Thr) / Tirosina (Tyr)		90 % v/v TFA, 30 min.
		0,1 M TBAF/DMF, 15 min. para a Tyr TFA, 15 min. para a Ser e Thr
Lisina (Lys)		Pd(PPh ₃) ₄ (0,1equiv.), PhSiH ₃ (24equiv.) em DCM, 10 min.
		2 % NH ₂ NH ₂ .H ₂ O em DMF, 5 a 10 min.
Glutamina (Gln)		90 % v/v TFA, 30 a 60 min.
		90 % v/v TFA, 1 h.

1.4.2 Reagentes de activação

As reacções de formação da ligação amida entre os aminoácidos por norma envolvem uma activação química, quer por meio de uma pré-activação do grupo carboxilo presente no aminoácido quer por activação *in situ* do mesmo. Este facto é também válido na SPFS e para promover essa activação recorre-se a um reagente de activação. Por norma, em SPFS, num acoplamento entre aminoácidos, ocorre inicialmente a activação do grupo carboxilo do aminoácido a acoplar seguindo-se um ataque nucleofílico por parte do grupo amina do aminoácido já acoplado à resina, Esquema 1.2.²⁵



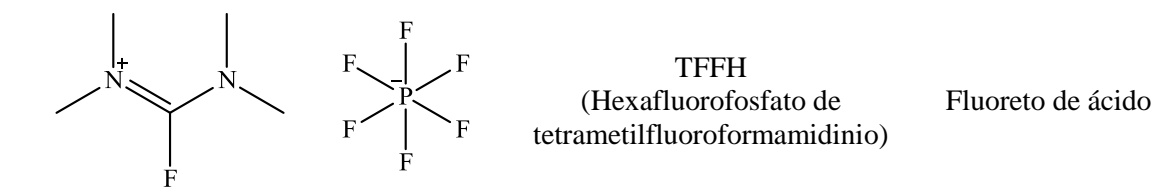
Esquema 1.2 Reacção de acoplamento genérico entre dois aminoácidos estando um dos aminoácidos acoplado a uma resina.

Factores como o tempo de activação, solvente, concentração, possíveis reacções laterais e tipo de funcionalização da resina devem ser tidos em conta na escolha do reagente de activação a utilizar de modo a se potenciar a reacção.

Estes reagentes são classificados de acordo com a sua similaridade, estando compreendidos em oito grandes grupos: reagentes de fosfónio, urónio, imónio, carbodiimida, imidólio, organo-fosforados, de halogenação de ácidos, cloroformato e piridínio.²⁵ Os reagentes de activação mais utilizados em SPFS estão apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Métodos de acoplamento mais usados no método de Sheppard.

Reagente de acoplamento	Nome	Espécie activada
	DIC (<i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida)	Anidrido simétrico ou ésteres de benzotriazolilo
	DCC (<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida)	Anidrido simétrico ou ésteres de benzotriazolilo
	PyBOP (Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfónio)	Ésteres de benzotriazolilo
	HATU (Hexafluorofosfato de <i>N</i> -(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridina-3-óxido)	Ésteres de 9-azabenzotriazolilo



Nas reacções de acoplamento entre aminoácidos é importante manter a integridade quiral das espécies envolvidas. Para tal recorre-se a reagentes conjuntos que previnem a racemização. Os reagentes mais utilizados para estas reacções, em SPFS, são: 1-hidroxibenzotriazole (HOBt, **5**) e 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt, **6**) (Figura 1.16).²⁶

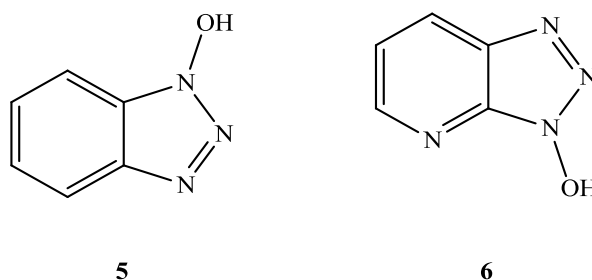
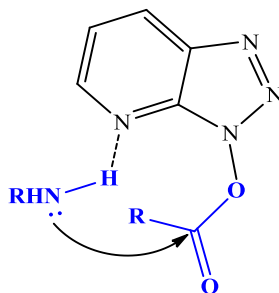


Figura 1.16 Estruturas do HOBt, (**5**) e do HOAt, (**6**).

Estes reagentes adicionados nas reacções de acoplamento permitem reduzir a extensão da racemização. Para tal pode ser usado um derivado de hidroxilamina, obtendo-se o éster correspondente.

A formação do éster pode ser promovida pois muitos destes reagentes têm uma estrutura X-OH, que podem ser convertidos em ésteres activos por reacção com o ácido carboxílico, Esquema 1.3.²⁶



Esquema 1.3 Mecanismo proposto no acoplamento com a presença do reagente HOAt a preto e a azul encontram-se representados dois aminoácidos figurativos que reagem.

Os reagentes de carbodiimida têm sido largamente utilizados na síntese de péptidos, porque eles apresentam uma actividade moderada e são razoavelmente baratos, como é o caso de DIC e DCC.²⁵

A escolha de uma base também é importante em reacções de acoplamento de péptidos. Bases úteis na síntese de péptidos são as aminas terciárias, tais como a diisopropiletilamina (DIPEA) e *N*-metilmorfolina (NMM) devido às suas propriedades não nucleofílicas da própria base.²⁵

1.4.3 Técnicas de monitorização

De modo a poder verificar o decorrer da síntese por SPFS foram optimizadas várias técnicas dando mais ênfase as técnicas não destrutivas, tais como IV²⁷, ¹³C-RMN em gel²⁸ e mais recentemente RMN HR-MAS^{29,30} que permite verificar a estrutura do péptido ainda acoplado à resina.

No método de Sheppard para uma verificação rápida e mais barata do acoplamento recorre-se ao teste de Kaiser, trata-se de um teste colorimétrico dando portanto uma informação meramente qualitativa.³¹ Pode-se medir também a concentração de dibenzofulveno libertado durante a remoção do grupo Fmoc através de espectroscopia de UV.²¹

1.5 Experiências de Ressonância Magnética Nuclear para o estudo de interacções moleculares

O reconhecimento do papel das interacções carbohidrato-receptor com um dos factores importantes nalgumas infecções bacterianas relacionadas levou a um foco no estudo das mesmas.³²

Uma das técnicas que se tem desenvolvido para a procura do entendimento das interacções carbohidrato-receptor tem sido a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).³²

Para o estudo das interacções carbohidrato-receptor (pequenos receptores), diversos parâmetros de RMN podem ser utilizados para analisar interacções, como por exemplo a variação do desvio químico, o efeito nuclear de Overhauser (NOE) para avaliar interacções intermoleculares e ainda efeito de difusão. Desta forma diversas experiências de RMN podem ser usadas para avaliar estas interacções, tais como *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (ROESY) e *diffusion-ordered spectroscopy* (DOSY).³²

A experiência de ROESY, inicialmente designada por CAMELSPIN “*cross relaxation appropriate for minimolecules emulated by locked spins*”, fornece informação sobre a proximidade próton-próton através do espaço.³³

No caso de moléculas grandes o sinal é negativo nos sinais de *cross-relaxation* entre a macromolécula e o carbohidrato, se a molécula for menor o sinal fica positivo ou até mesmo zero. O facto do carbohidrato em solução apresentar interacções muito fortes com os receptores e a troca rápida da forma ligada e complexada são alguns dos factores que levam ao recurso desta técnica.³²

A técnica de DOSY é uma experiência bidimensional onde uma dimensão é responsável pelo desvio químico convencional e outrepelo comportamento da difusão. Esta técnica é comparável com uma cromatografia, pois o sinal decai exponencialmente de acordo com o comportamento de difusão e cada molécula individualmente. O comportamento de difusão está relacionada com as propriedades de uma molécula, desde do tamanho, à forma, massa, carga, em que solução se apresenta, da temperatura ou do estado de agregação, cada componente numa mistura pode ser individualizado tendo como base o seu próprio coeficiente de difusão.^{32,34}

Na Figura 1.17 encontra-se um exemplo da experiência de DOSY, a azul estão representados os ligandos livres que passam a vermelhos quando interagem com determinado receptor. Nos espectros obtidos verifica-se uma alteração da região vertical do espectro, esta alteração pode-se comparar com um efeito cromatográfico pois a alteração será tanto maior quanto intensa for a interação.

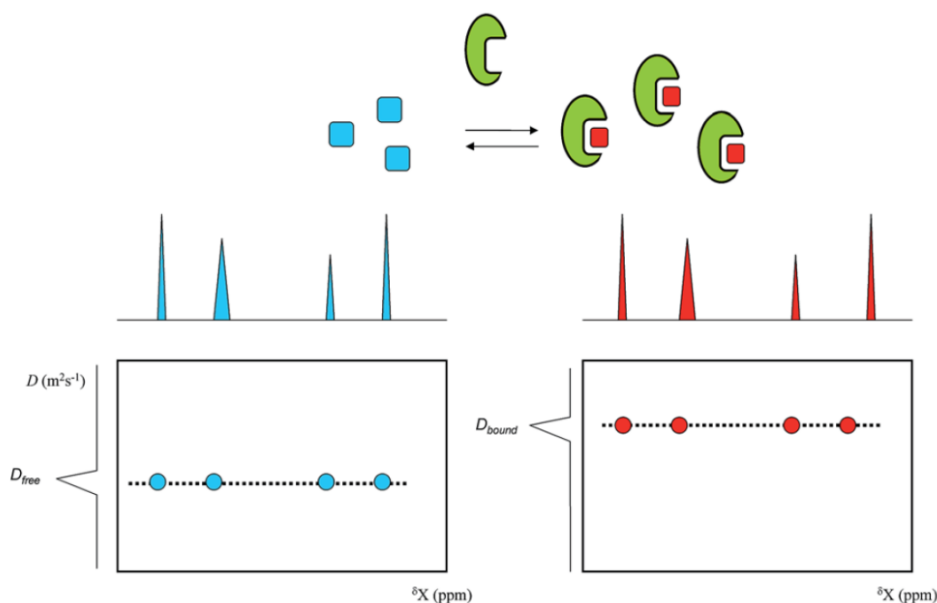


Figura 1.17 Figura ilustrativa do efeito da experiência de DOSY, a azul observa-se os ligandos e a vermelha observa-se os ligandos acoplados aos receptores (adaptado de Jiménez-Barbero *et al.*).³⁵

O estudo do reconhecimento da parede bacteriana por parte da vancomicina (**1**) tem sido estudado ao longo dos anos recorrendo-se a experiências de RMN.^{6, 8, 36-38} Foram também explorados estudos teóricos entre a vancomicina (**1**) e pequenos péptidos com a sequência do terminal peptídico do PGN natural (L-Lys-D-Ala-D-Ala) para avaliar esta interação.^{39, 40}

Mais recentemente o grupo de Boger *et al.*,^{9, 41} tem estudado este reconhecimento na perspectiva da vancomicina (**1**), tendo realizado a síntese total deste composto e efectuado estudos de interação com cadeias tripeptídicas com a sequência terminal do PGN natural e um modificado (L-Lys-D-Ala-D-Lac) detectado em bactérias resistentes a metilicina (MRSA). Este ano, o grupo de Jimenez-Barbero *et al.*,⁴² publicou estudos de interação de um dipéptido *N*-acetilado e diversos antibióticos glicopéptídicos utilizando a técnica de RMN como ferramenta.

Apesar dos estudos já feitos até à data, a resistência de bactérias a antibióticos como a vancomicina continua a ser um problema. Ainda não se compreendeu se restante cadeia peptídica do PGN e a presença da unidade MurNAc têm um papel importante no reconhecimento, bem como o efeito de outros resíduos terminais como D-Ser e Gly.^{10, 43}

É nesta necessidade de entender que alterações as bactérias estão a realizar na sua parede celular e de que forma essa alteração influencia a eficiência dos antibióticos glicopéptidicos e o seu reconhecimento, que se enquadra o nosso trabalho. Para um melhor entendimento a nível molecular do reconhecimento entre a vancomicina e o PGN pode-se recorrer às técnicas referidas ao longo do capítulo como ferramentas, sendo esta uma área em grande expansão.

2 Apresentação e discussão de resultados

Com este trabalho pretendeu-se sintetizar uma pequena biblioteca de pequenos muropéptidos, e as cadeias peptídicas correspondentes, com composição diferente no resíduo terminal da cadeia (D-Ala, Gly e D-Ser) e estabelecer uma base estrutural para a compreensão da interacção de vancomicina (**1**) com um dos elementos principais da parede celular bacteriana – o PGN.

Desta forma pretendeu-se contribuir para uma melhor compreensão da interacção da vancomicina com pequenos muropéptidos, bem como apontar uma estratégia sintética mais viável para a preparação destes compostos com elevada pureza que por via natural são de difícil obtenção. Para tal, a estratégia sintética foi dividida em três fases principais:

1. Síntese da unidade MurNAc por síntese ortogonal (Figura 2.1-A);
2. Preparação das cadeias peptídicas pelo método SPFS (Figura 2.1-B);
3. Acoplamento da unidade MurNAc aos péptidos (Figura 2.1-C).

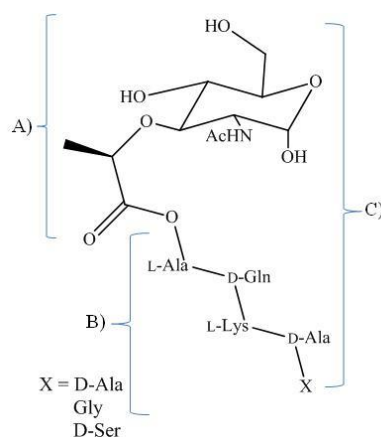
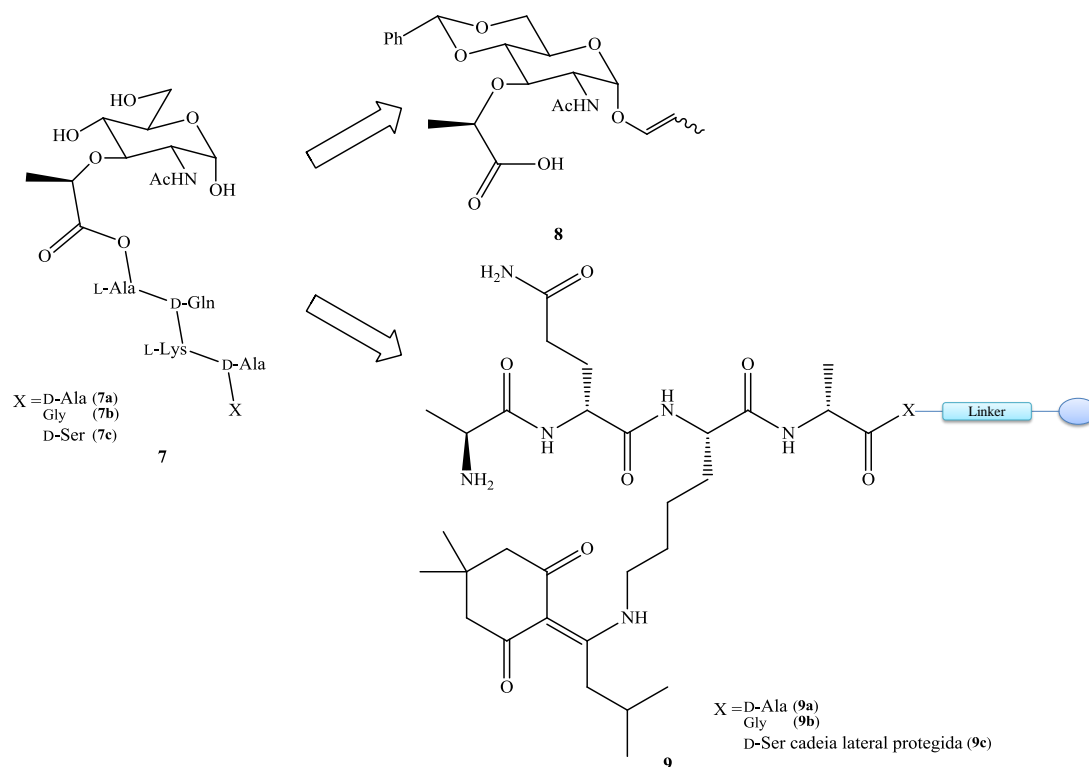


Figura 2.1 Estrutura dos muropéptidos pretendidos.

De acordo com a análise retrossintética (Esquema 2.1) para a obtenção dos muropéptidos (**7**), estes podem ser obtidos por acoplamento entre dois intermediários: o sintão (**8**) obtido a partir de glucosamina através de uma estratégia de protecção ortogonal; as cadeias peptídicas (**9**) que podem ser preparadas pelo método SPFS.



Esquema 2.1 Análise retrossintética dos muropéptidos 7a (terminal D-Ala), 7b (terminal Gly) e 7c (terminal D-Ser).

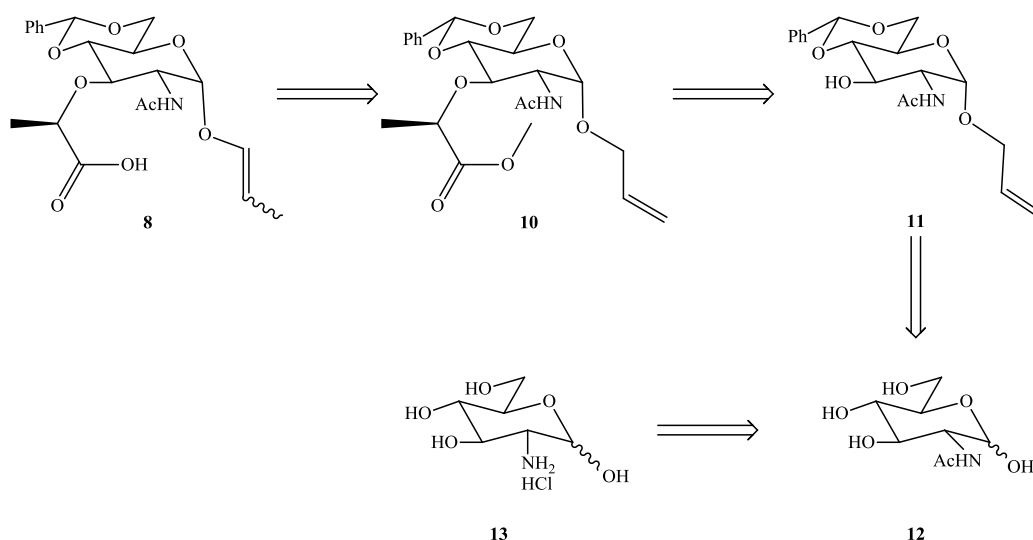
Procedeu-se aos estudos de ROESY preliminares da interação entre unidade MurNAc e a vancomicina (**1**).

2.1 Preparação do derivado de MurNAc

A síntese do precursor da unidade MurNAc protegida foi efectuada tendo em vista duas estratégias ortogonais de protecção, tendo como preocupação a escolha dos grupos protectores compatíveis com as condições do acoplamento às cadeias peptídicas sintetizadas pelo método SPFS, e a fácil remoção destes grupos numa fase posterior.

Estruturalmente é possível verificar que a unidade MurNAc tem como núcleo base a glucosamina, apresentando o grupo amina na posição C-2 acetilado e no grupo hidroxilo na posição C-3 o grupo lactilo.

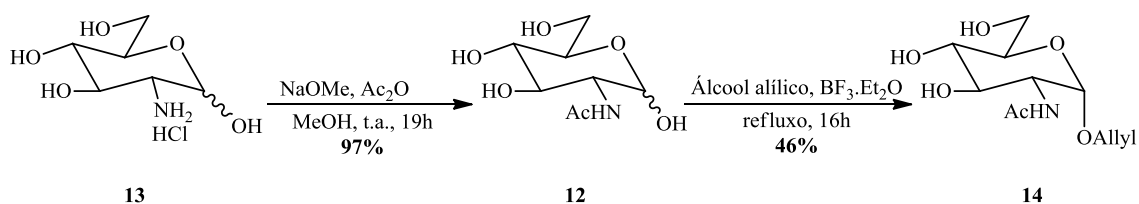
Uma vez que a unidade MurNAc contém o grupo amina acetilado, pensou-se numa primeira abordagem utilizar a *N*-acetil-glucosamina (**12**) como material de partida, uma vez que é comercial ou facilmente preparada a partir de **13**, e como grupo protector da posição anómérica o grupo alilo. Desta forma a primeira abordagem para preparar o derivado de MurNAc teve como estratégia o plano retrossintético apresentado no Esquema 2.2.



Esquema 2.2 Plano retrosintético segundo a estratégia via *N*-acetil-glucosamina.

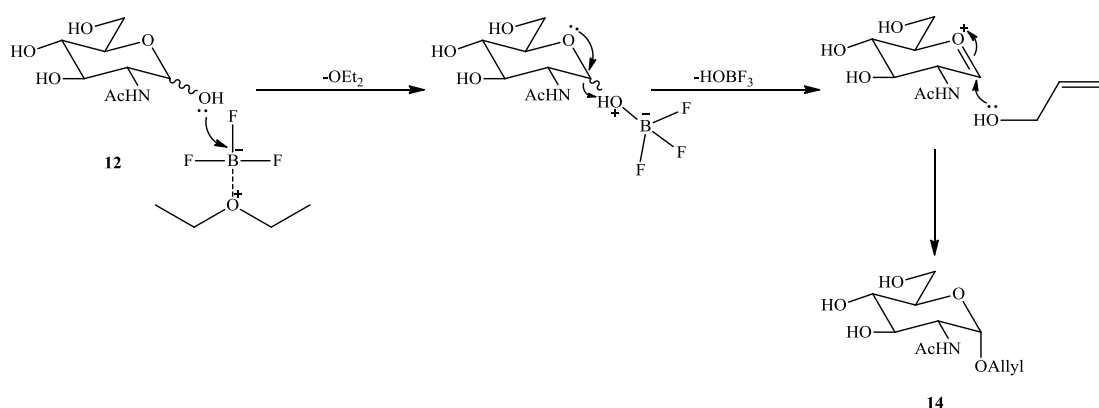
2.2 Unidade MurNAc via *N*-acetil-glucosamina

De acordo com o plano retrosintético traçado (Esquema 2.2), a *N*-acetil-glucosamina facilmente obtida por *N*-acetilação da glucosamina comercial, foi utilizada como de material de partida. Para tal seguiu-se o protocolo utilizado por Keppler *et al.*,⁴⁴ em que se utilizou anidrido acético na presença de metóxido de sódio. A protecção do grupo hidroxila da posição anomérica com um grupo alilo foi efectuada por tratamento com álcool alílico na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, em refluxo, verificando-se a formação dos dois possíveis anómeros β e α por c.c.f., sendo o anómero α maioritário (Esquema 2.3).⁴⁵ A formação do produto de alilação foi confirmada por ^1H -RMN, principalmente pela presença dos sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons dos grupos acetilo e alilo: 5,87ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,29ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,13ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,08ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,89ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) e 1,83ppm (NCOCH_3).



Esquema 2.3 Síntese do derivado de *N*-acetil-glucosamina, composto 14.

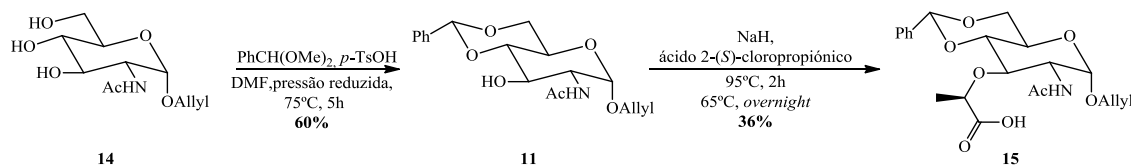
O $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ comporta-se como ácido de Lewis activando o grupo hidroxila anomérico ocorrendo formação do ião intermediário óxonio, o ataque por parte do álcool alílico ocorre de forma enantioselectiva (Esquema 2.4).



Esquema 2.4 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 14.

Os grupos hidroxilo *O*-4 e *O*-6 foram protegidos pela formação de um acetal de benzilideno. Este grupo apresenta estabilidade nas condições SPFS, ou seja, estável em condições básicas nos acoplamentos e sensível quando sujeito a condições ácidas.

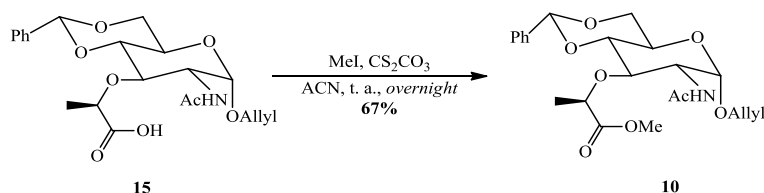
A formação do acetal de benzilideno (**11**) ocorre por tratamento de **14** com o benzaldeído dimetilacetal na presença catalítica de *p*-TsOH, sob pressão reduzida. Devido à reversibilidade da reacção esta tem de ser bastante controlada para que se obtenha o rendimento mais elevado possível, no caso foi de 60%. De seguida procedeu-se à inserção do grupo lactilo. Desta forma o composto **11** foi dissolvido em dioxano e adicionou-se NaH, que desprotona o único hidroxilo livre do composto **11** promovendo uma reacção S_N2 com o ácido 2-(*S*)-cloropropiónico (Esquema 2.5).



Esquema 2.5 Síntese do composto 15.

O produto **15** foi confirmado por ^1H -RMN com os sinais a 7,41ppm dos prótons do anel aromático, a 5,61ppm do metino (CH) do anel de acetal, a 4,14ppm do metino do grupo lactilo e a 1,48 ppm do metilo do grupo lactilo.

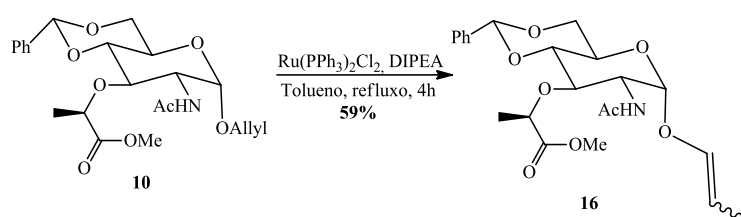
De modo a proteger o ácido carboxílico presente em **15** recorreu-se a uma metilação usando uma base forte, no caso CS_2CO_3 . Esta promove a desprotonação do grupo hidroxilo criando uma estabilização de ressonância. Essa carga negativa ataca nucleofílicamente o iodeto de metilo libertando o iodeto que é um bom grupo de saída (Esquema 2.6).



Esquema 2.6 Síntese do composto 10.

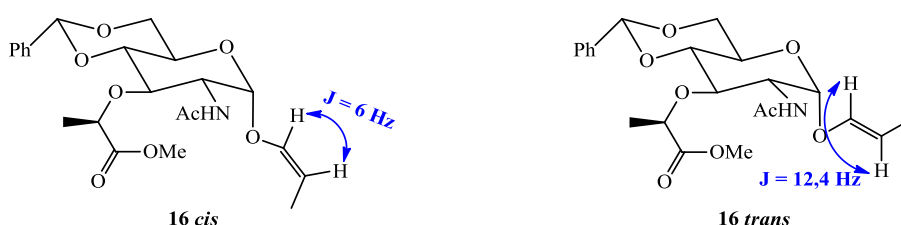
Vários métodos para a desprotecção de éteres de alilo foram já descritos na literatura,⁴⁶ a maior parte dos métodos envolve a isomerização do grupo alilo para prop-1-enilo éteres. A isomerização permite uma remoção fácil deste grupo em condições que coincidem com a clivagem do muropéptido da resina, condições ácidas como 2% de TFA em DCM.⁴⁶

O catalisador diclorotris(trifenilfosfina) ruténio(II) ($\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$) é um catalisador de Grubbs que é utilizado em reacções de isomerização e apresenta um custo relativamente mais baixo que outras alternativas. Este método permite efectuar as reacções de isometização na presença de diversos grupos funcionais e em condições suaves (Esquema 2.7).⁴⁶



Esquema 2.7 Síntese do composto **16**.

Por ^1H -RMN verifica-se a isomerização quase total do composto **16** pelo desaparecimento de um multiplete a 5,11ppm referente ao protão do grupo metileno do grupo alilo, aparecendo um duplete a 6,07ppm relativo ao protão olefinico, mais propriamente dois, um do produto *trans* e outro do produto *cis* apresentando uma razão de 1:2 entre eles (esquema 2.8).

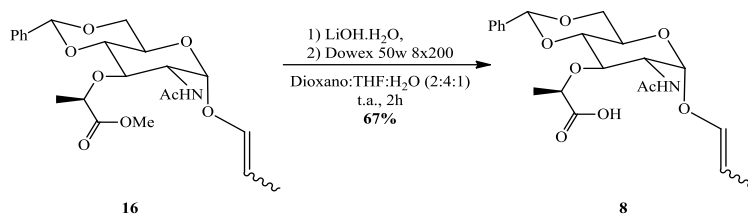


Esquema 2.8 Representação do produto *cis* e do produto *trans* obtido na isomerização e as respectivas constantes de acoplamento.

Problemas no processo de purificação do composto **16**, para remoção do catalisador, levaram a uma diminuição do rendimento, relativamente ao esperado após a observação do ^1H -RMN do crude.

De modo a se obter o composto **8**, com o ácido carboxílico livre, para futura activação e acoplamento com o péptido pelo método SPFS, procedeu-se à hidrólise do éster **16** com $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ numa mistura de solventes, dioxano:THF: H_2O (2:4:1) segundo o protocolo de Fukase *et al.*⁴⁷

A mistura foi purificada numa coluna cromatográfica com uma resina de permuta iónica (Esquema 2.9). Por ^1H -RMN verifica-se o desaparecimento do sinal referente aos prótons do grupo metilo do éster que no composto **16** aparecia como um singuleto a 3,82ppm.



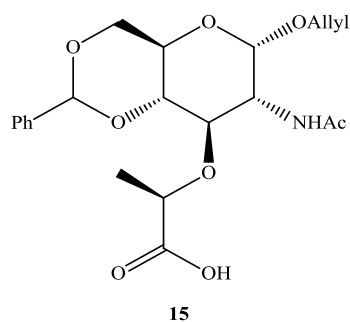
Esquema 2.9 Síntese do composto **8**.

Seguindo esta via de síntese, foi possível obter a unidade MurNAc protegida nas posições essenciais para o acoplamento com o péptido pelo método SPFS. Contudo a estratégia apresenta alguns problemas e limitações, principalmente na quantidade final obtida do composto **8**. O rendimento global da síntese foi aproximadamente de 3%, fazendo como que seja difícil produzir quantidades significativas de **8** para o acoplamento ao péptido, uma vez que no método SPFS por cada péptido são necessários 6 equivalentes do composto **8**, para garantir uma eficiência na reacção de acoplamento. No processo de síntese o passo que apresenta menor rendimento é onde ocorre a inserção do grupo lactilo na posição C-3 da glucosamina.

Os dados espectroscópicos dos produtos obtidos no decorrer desta síntese estão resumidos na Tabela 2.1.

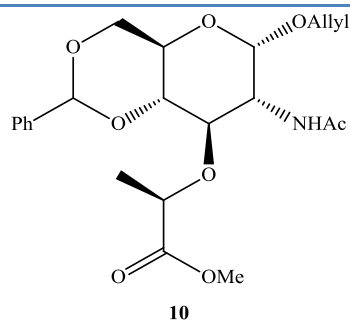
Tabela 2.1 Dados espectroscópicos de **IV** (em cm⁻¹) e ¹H-RMN (em ppm) dos produtos obtidos na síntese da unidade MurNAc via *N*-acetil-glucosamina.

Composto sintetizado	IV	¹ H-RMN
<p style="text-align: center;">12</p>	3460 (F, OH) 1626 (F, C=O amida)	anómero α: 7,63 (1H, m, NH), 6,39 (1H, d, J=3,9 Hz, OH-1), 4,92 (2H, m, H-1, OH-4), 4,67 (1H, m, OH-3), 4,42 (1H, m, OH-6), 3,56 (5H, m, H-2, H-5, H-3, H-6), 3,10 (1H, m, H-4), 1,82 (3H, s, CH ₃) anómero β: 7,76 (1H, m, NH), 6,48 (1H, d, J=5,6 Hz, OH-1), 4,92 (2H, m, OH-3, OH-4), 4,53 (1H, m, OH-6), 4,42 (1H, m, H-1), 3,56 (2H, m, H-6), 3,29 (2H, m, H-2, H-4), 3,10 (2H, m, H-3, H-5), 1,82 (3H, s, CH ₃)
<p style="text-align: center;">14</p>	3476 (F, OH) 1639 e 1619 (F, C=C)	7,84 (1H, d, J=7,2 Hz, NH), 5,87 (1H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 5,29 (1H, dd, J=17,2 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 5,13 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 4,69 (1H, d, J=2,8 Hz, H-1), 4,08 (1H, dd, J=14,4 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 3,89 (1H, dd, J=5,2 e 13,6 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 3,61 (2H, m, H-2, H-6), 3,47 (3H, m, H-6, H-3, H-5), 3,16 (1H, m, H-4), 1,83 (3H, s, NCOCH ₃)
<p style="text-align: center;">11</p>	3306 (F, OH) 1651 (F, C=O amida)	7,98 (1H, d, J=8,4 Hz, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 5,89 (1H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 5,61 (1H, s, Ph-CH), 5,34 (2H, 2d, J=17,2 e 10 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 4,76 (1H, d, J=3,2 Hz, H-1), 4,14 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , H-5), 3,96 (1H, dd, J=13,6 e 5,6 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 3,96 (1H, dd, J=13,6 Hz e 5,60, CH ₂ CH=CH ₂), 3,83 (1H, m, H-2), 3,69 (3H, m, H-4, H-5, H-6), 1,85 (3H, s, NHCOCH ₃)



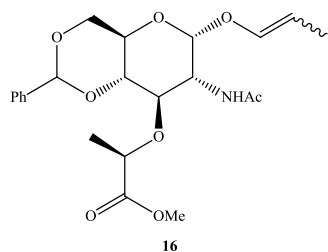
3433 (F, OH)
1649 (F, C=O amida)

8,30 (1H, d, J=5,2 Hz, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 5,88 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 5,61 (1H, s, Ph-CH), 5,32 (1H, d, J=17,1 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,17 (1H, d, J=10,4 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,80 (1H, s, H-1), 4,14 (4H, m, H_α lactato, CH₂CH=CH₂, H-6), 3,95 (1H, dd, J=4,8 e 13,6 Hz, CH₂CH=CH₂), 3,68 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 1,84 (3H, s, NHCOCH₃), 1,48 (3H, d, J=6,8 Hz, CH₃ lactato)



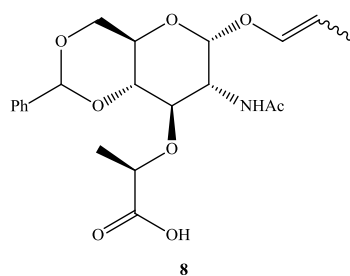
1732 (F, C=O éster)
1654 (F, C=O amida)

7,54 (1H, m, NH), 7,42 (5H, m, Ar-H), 5,88 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-CH), 5,25 (3H, m, CH₂CH=CH₂, H-1), 4,53 (1H, q, J=13,6 e 6,4 Hz, H_α lactato), 4,26 (1H, m, H-3), 4,14 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 4,00 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 3,76 (8H, m, COOCH₃, H-2, H-4, H-5, H-6), 2,06 (3H, s, NHCOCH₃), 1,42 (3H, d, J=6,8 Hz, CH₃ lactato)



Não foi traçado

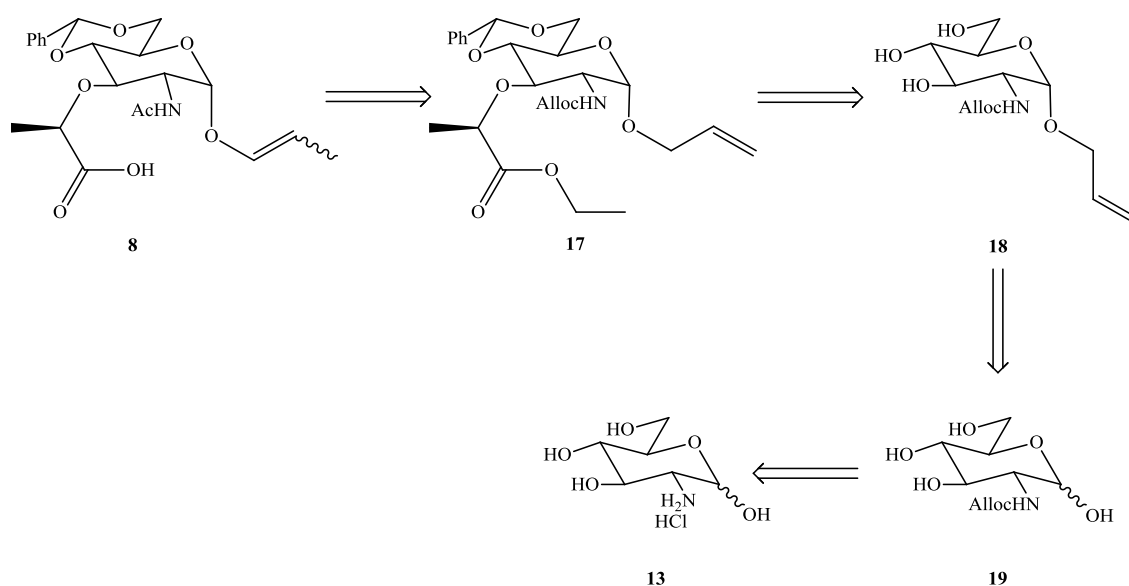
7,62 (1H, m, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 6,07 (1H, 2d, J=12,4 e 6,0 Hz, CH=CHCH₃), 5,59 (1H, d, H-1), 5,50 (1H, s, Ph-CH), 4,56 (2H, m, H_α lactato, CH=CHCH₃), 4,25 (1H, m, H-2), 3,82 (8H, m, H-5, H-4, H-3, H-6, COOCH₃), 2,05 (3H, s, NHCOCH₃), 1,58 (3H, 2d, J=6,8 Hz, CH=CHCH₃), 1,43 (3H, m, CH₃ lactato)



Não foi traçado

7,61 (1H, m, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 6,04 (1H, 2d, J=12,8 Hz, CH=CHCH₃), 5,57 (1H, d, H-1), 5,20 (1H, s, Ph-CH), 4,18 (2H, m, H_α lactato, H-2, CH=CHCH₃), 3,74 (5H, m, H-5, H-4, H-3, H-6), 1,93 (3H, s, NHCOCH₃), 1,50 (3H, 2d, J=21,2 e 5,6 Hz, CH=CHCH₃), 1,35 (3H, m, CH₃ lactato)

Devido aos baixos rendimentos obtidos considerou-se a síntese a partir da *N*-alloc-glucosamina (19) como material de partida, apesar de envolver mais passos de síntese, adaptando-se a aproximação de Fukase *et al.* que utilizou este grupo na preparação de dissacáridos (Esquema 2.10).¹⁴

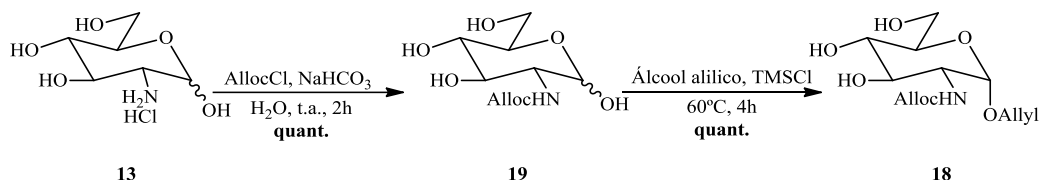


Esquema 2.10 Plano retrosintético segundo a estratégia de síntese da *N*-alloc-glucosamina.

2.3 Preparação de um derivado de MurNAc via *N*-Alloc-glucosamina

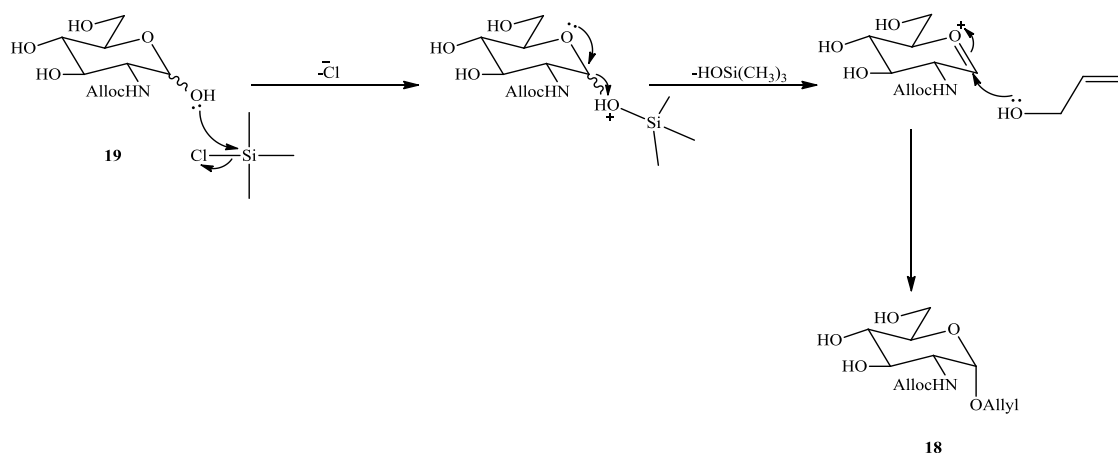
Face aos problemas na primeira abordagem, que visava utilizar a *N*-acetil-glucosamina como material de partida na preparação de um derivado de MurNAc, evitando passos de protecção e desprotecção do grupo amina, pensou-se em proteger o grupo amina com o grupo aliloxycarbonil (Alloc). Este grupo protector permite a inserção do grupo lactilo em *O*-3 com elevado rendimento, conforme descrito por Fukase *et al.*¹⁴ Este grupo de investigação havia utilizado esta abordagem para preparar um derivado de MurNAc para posterior reacção de glicosidação, em que este derivado é utilizado como doador. Neste trabalho pretendeu-se sintetizar um derivado de MurNAc que permitisse o seu acoplamento a um péptido imobilizado num suporte sólido.

A síntese a partir do derivado de *N*-alloc-glucosamina iniciou-se coma protecção do grupo amina da glucosamina comercial.¹⁴ Para tal utilizou-se o grupo aliloxycarbonil, descrito na literatura como estável em condições básicas como as necessárias a utilizar no decorrer da síntese, sendo substituído pelo grupo acetilo numa fase mais avançada da síntese. Esta protecção foi efectuada na presença do cloreto de aliloxycarbonil e NaHCO₃ em H₂O. De seguida procedeu-se a uma alilação na posição anomérica por tratamento com o álcool alílico, por c.c.f. verificou-se a formação de dois anómeros não se tendo efectuada a sua separação (Esquema 2.11). Apesar de não se efectuar a purificação do produto da alilação, a presença deste foi confirmadano espectro de ¹H-RMN, principalmente os sinais grupo aliloxycarbonil e alilo: 5,89ppm (CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 5,24ppm (CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 4,87ppm (CH₂CH=CH₂) e 3,93ppm (CH₂CH=CH₂).



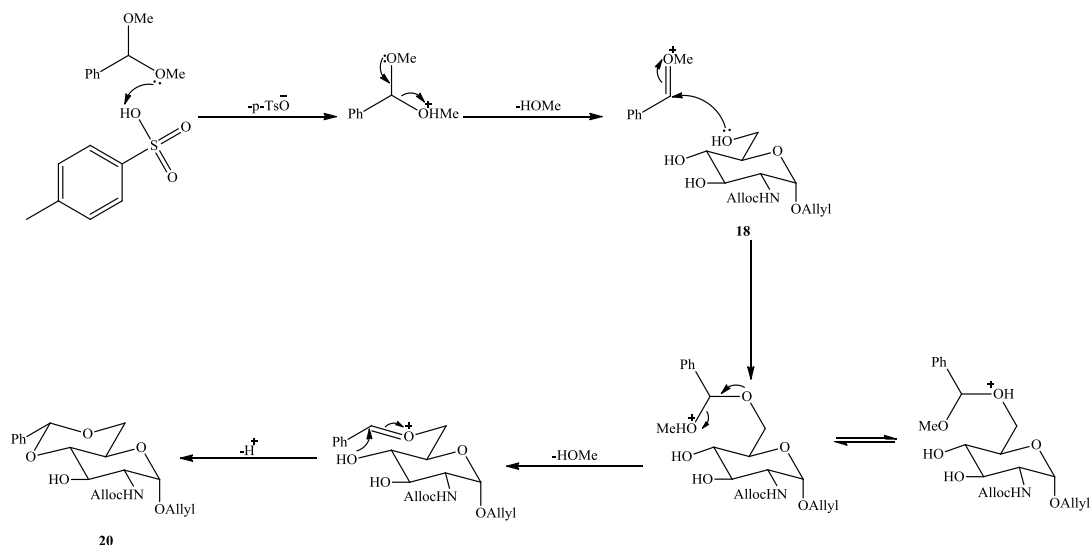
Esquema 2.11 Síntese do derivado de *N*-alloc-glucosamina 18.

Na reacção de alilação a presença do cloreto de trimetilsililo funciona como um activador da posição anomérica do derivado de *N*-alloc-glucosamina gerando um bom grupo de saída. Ocorre então formação do ião oxocarbenio, e a presença do grupo alloc na posição adjacente promove a formação de um ião acetoxínio que será posteriormente atacado pelo álcool alílico. À formação a um produto maioritário que será o anómero α , apesar de se formar também o anómero β (Esquema 2.12).



Esquema 2.12 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 18 baseado no trabalho de Fraser-Reid *et al.*¹⁹

Tal como na primeira abordagem, os grupos hidroxilo *O*-4 e *O*-6 foram protegidos sob a forma de um acetal de benzilideno. Este grupo é normalmente utilizado na protecção de dióis 1,2-*cis* apresentando estabilidade em condições básicas mas não em condições ácidas (Esquema 2.13).

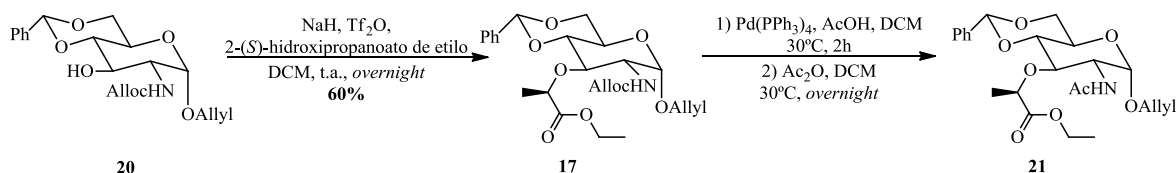


Esquema 2.13 Mecanismo proposto para a obtenção com composto 20.

A formação do acetal de benzilideno foi confirmada por ^1H -RMN onde se destaca principalmente os prótons aromáticos a 7,42ppm e o sinal referente ao metino a 5,59ppm.

O tratamento do composto **20** com NaH e éster 2-(*S*)-trifluorometanosulfonyl-propanoato de etilo, preparado de fresco, a partir do álcool correspondente permitiu a inserção do grupo lactilo na posição *O*-3. O uso de DCM como solvente ajuda a promover a reacção de $\text{S}_{\text{N}}2$ entre o composto **20** e o triflato. Esta reacção apresentou grande sensibilidade às condições reaccionais levando a que os rendimentos não fossem sempre reprodutíveis, sendo que o rendimento mais elevado foi de 60%. O composto **17** foi confirmado por ^1H -RMN, pela presença de um quarteto a 4,50ppm (H_{α} lactato) e um duplete a 1,42ppm (CH_3 lactato).

Tendo em conta a estrutura do grupo protector aliloxycarbonilo é possível que no processo seguinte de isomerização este possa ficar comprometido. Uma vez que se pretende obter a unidade MurNAc, decidiu-se remover o grupo aliloxycarbonilo e acetilar o grupo amina antes de realizar o passo de isomerização. Desta forma, procedeu-se à remoção do grupo aliloxycarbonilo por tratamento de **17** com $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$,²¹ na presença de ácido acético seguindo de acetilação com anidrido acético (Esquema 2.14).



Esquema 2.14 Estratégia de síntese para obtenção do composto **21**.

Por falta de disponibilidade de tempo não houve oportunidade de proceder à optimização necessária para a síntese do composto **21**, mas o rendimento global, de 38%, demonstra que esta via poderá ser usada em estudos futuros para a síntese dos derivados de MurNAc.

Os dados espectroscópicos dos produtos obtidos no decorrer desta síntese estão resumidos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Dados espectroscópicos de **IV** (em cm^{-1}) e ^1H -RMN (em ppm) dos produtos obtidos na síntese da unidade MurNAc via *N*-alloc-glucosamina.

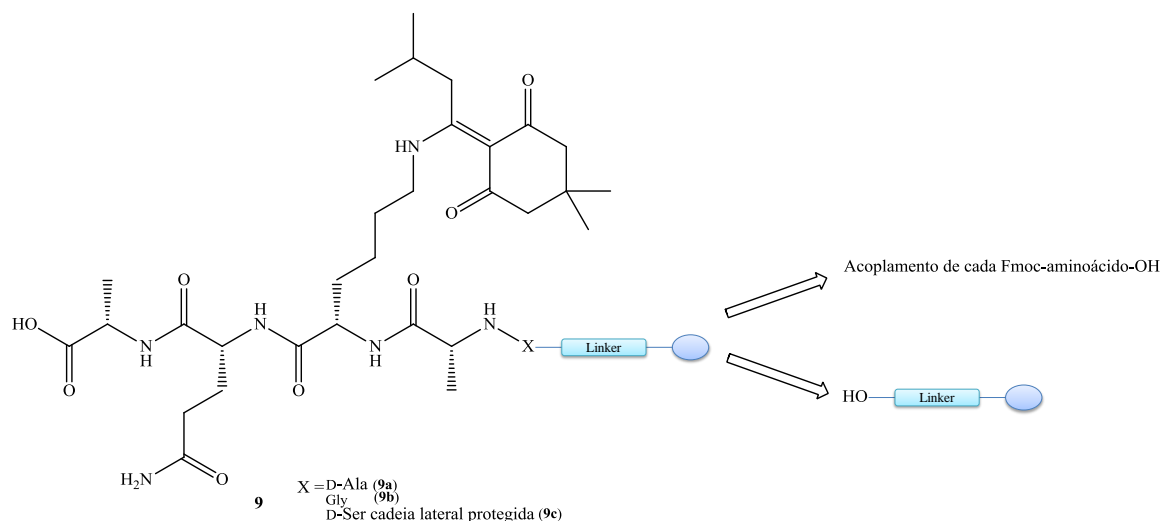
Composto sintetizado	IV	^1H -RMN
<p>19</p>	3374 (l, OH) 1687 (F, C=O carbamato)	6,65 (1H, d, $J=8,0$, NH), 6,42 (1H, m, OH), 5,90 (1H, m, $\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,30 (1H, d, $J=17,6$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,16 (1H, d, $J=10,4$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,94 (2H, m, $H-1$, OH), 4,72 (1H, m, $H-4$), 4,44 (3H, m, $\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $H-6$), 3,33 (6H, m, $H-2$, $H-3$, $H-5$, OH)

<p>18</p>	3319 (l, OH) 1694 (F, C=O carbanato)	5,89 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,52 (1H, d, J=6,8 Hz, OH), 5,24 (4H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂), 4,87 (1H, m, H-1), 4,56 (2H, m, OH), 4,15 (1H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 3,93 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 3,60 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 2,16 (1H, s, OH)
<p>20</p>	3324 (f, OH) 1693 (F, C=O carbamato)	7,42 (5H, m Ar-H), 5,91 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,56 (1H, s, Ph-CH), 5,29 (4H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,13 (1H, s, NH), 4,89 (1H, m, H-1), 4,60 (2H, d, J=3,6 Hz, COOCH ₂ CH=CH ₂), 4,27 (1H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 4,20 (1H, dd, J=4,5 e 12,3 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 3,89 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-6b, CH ₂ CH=CH ₂), 3,56 (1H, t, J= 8,0 e 16 Hz, H-5), 2,79 (1H, s, OH)
<p>21</p>	Não foi traçado	7,42 (5H, m, Ar-H), 6,61 (1H, d, J=2,0 Hz, NH), 5,91 (2H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,58 (1H, s, Ph-CH), 5,24 (5H, m, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH=CH ₂ , H-1), 4,60 (2H, m, COOCH ₂ CH=CH ₂), 4,50 (1H, q, J=6,8 e 7,2 Hz, H α lactato), 4,27 (4H, m, H-3, CH ₂ CH=CH ₂ , COOCH ₂ CH ₃), 4,01 (1H, m, CH ₂ CH=CH ₂), 3,76 (5H, m, H-2, H-4, H-5, H-6), 1,42 (3H, d, J=6,8 Hz, CH ₃ lactato), 1,28 (3H, t, J=7,2 e 14,4 Hz, COOCH ₂ CH ₃)

Comparando as duas vias utilizadas, no caso da via da *N*-acetil-glucosamina, via mais directa, foi possível a obtenção da unidade MurNAc protegida (**8**) mas com um rendimento global baixo. Já no caso da via da *N*-alloc-glucosamina não foi possível obter a unidade MurNAc (**8**), devido à limitação de tempo, mas o rendimento global mostra grande potencialidade.

2.4 Síntese SPFS dos péptidos

Como já foi referido no início do Capítulo 2 a síntese de muropéptidos passa não só pela síntese da unidade MurNAc mas também pela síntese das cadeias peptídicas pretendidas. Estas cadeias foram sintetizadas pelo método SPFS, partindo da resina com o *linker* disponível e dos vários aminoácidos com a funcionalidade amina protegida e no caso da D-Ser com a cadeia lateral, grupo hidroxilo, protegido (Esquema 2.15).



Esquema 2.15 Esquema simplificado da estratégia de síntese dos peptídeos: 9a (terminal D-Ala), 9b (terminal Gly) e 9c (terminal D-Ser).

Para a aplicação do método SPFS utilizou-se a resina HMPB-MBHA (resina ácido4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutirico 4-metilbenzidrilamida), que se encontra disponível comercialmente (Novabiochem). Recorreu-se a esta resina pois pertence ao grupo das resinas que ao clivar o éster formado entre o *linker* e o ácido carboxílico do aminoácido obtêm-se o C-terminal da cadeia natural no PGN. Outra particularidade bastante importante é a resina ser extremamente lábil em condições ácidas.^{48, 49}

Foi utilizado um peptídeo já acoplado a uma outra resina, HMPB-AM, que tinha sido sintetizado no grupo pela Mestre Marina Pires. Esta resina foi descontinuada e por essa razão não foi possível continuar a usá-la como suporte sólido para a síntese dos peptídeos propostos neste trabalho (Figura 2.2).¹⁷

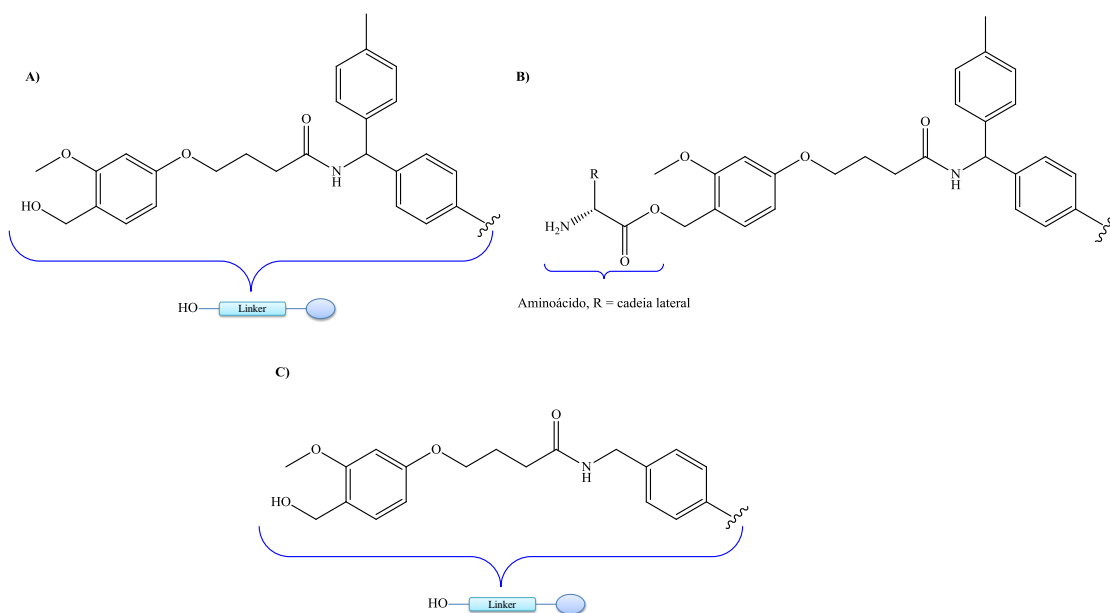
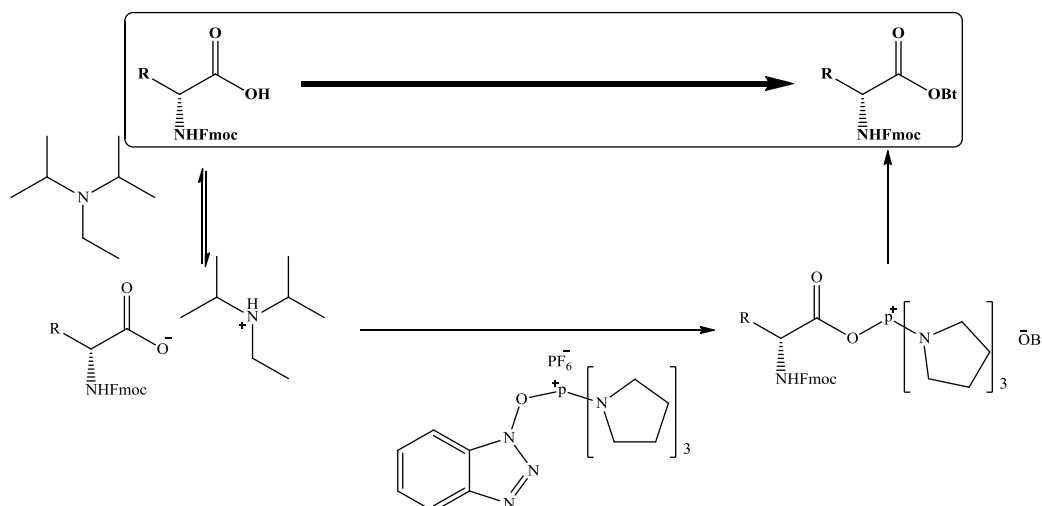


Figura 2.2 A) Estrutura do *linker* da resina HMPB-MBHA. B) Aminoácido genérico ligado por uma ligação éster ao hidroxilo de ligação representando a ligação formada na construção do peptídeo pelo método SPFS. C) Estrutura do *linker* da resina HMPB-AM.

As condições de SPFS utilizadas na síntese dos péptidos foram adaptadas do procedimento descrito por Mariuzza *et al.*,⁵⁰ utilizando como reagente de activação o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(pirrolidina)fosfónio (PyBOP), e como reagente auxiliar o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) e a amina diisopropiletilamina (DIPEA) como base (Esquema 2.16).



Esquema 2.16 Mecanismo proposto para a activação de um aminoácido com os reagentes PyBOP, HOBt e DIPEA.

O ciclo utilizado de SPFS encontra-se esquematizado na Figura 2.3. A activação de cada um dos aminoácidos foi efectuada durante 15 min, os reagentes no acoplamento foram utilizados a 4 equivalentes excepto para o primeiro aminoácido da cadeia (6equiv para a D-Ala e Gly e 10equiv para a D-Ser). A remoção do grupo Fmoc foi efectuada com lavagens sucessivas de 10min cada lavagem.

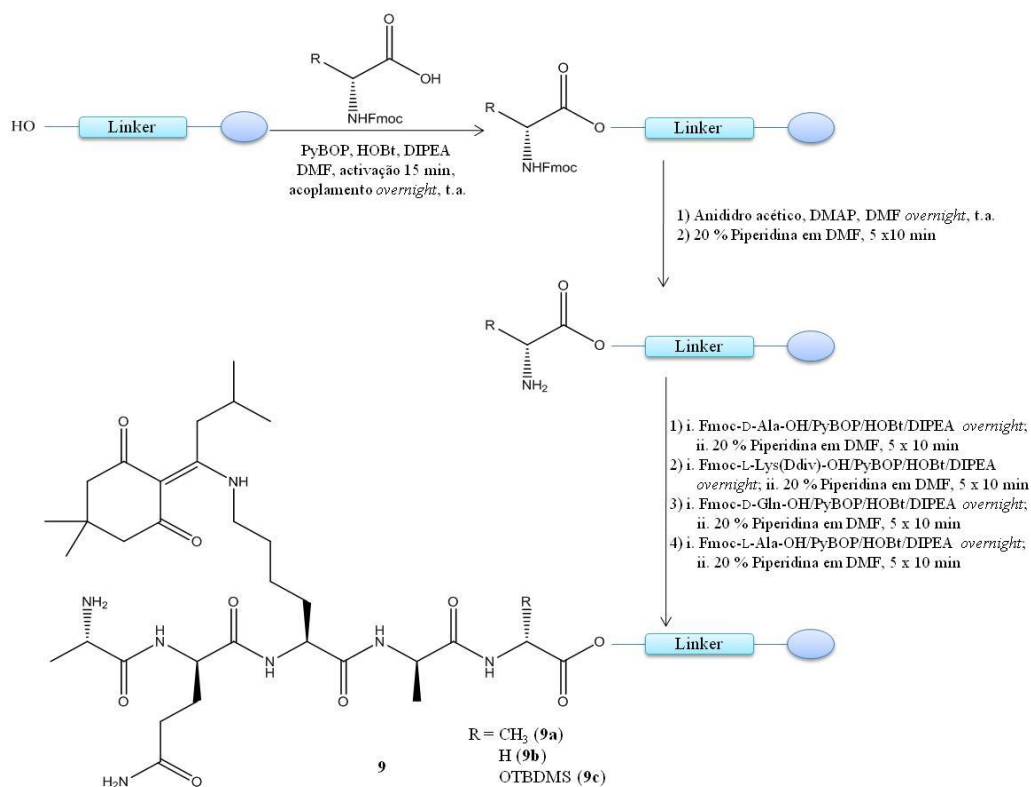


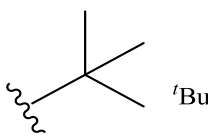
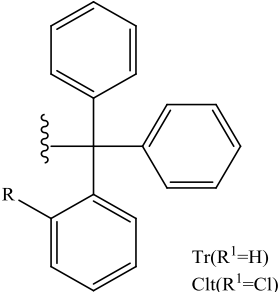
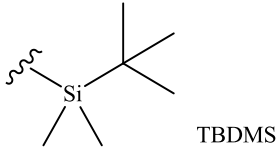
Figura 2.3 Ciclo utilizado de SPFS esquematizado para os péptidos 9.

Entre cada acoplamento e remoção de grupos protectores procedeu-se ao teste de Kaiser, que se baseia na reacção de uma pequena quantidade de resina contendo uma amina livre e o reagente de ninidrina. É um ensaio muito sensível para as aminas primárias (um pouco menos adequados para aminas secundárias), em que inicialmente a solução adquire uma cor azul intensa, e após aquecimento esta cor desaparece dando lugar ao desenvolvimento de uma cor vermelha acastanhada. À pequena porção de resina é colocada 2-5 gotas de três soluções (5g de ninidrina em 100mL de etanol, 80g de fenol em 20mL de etanol e 2mL de 0,001M de KCN em H₂O em 98mL de piridina) aquece-se a mistura a 100°C e verifica-se o resultado colorimétrico.³¹

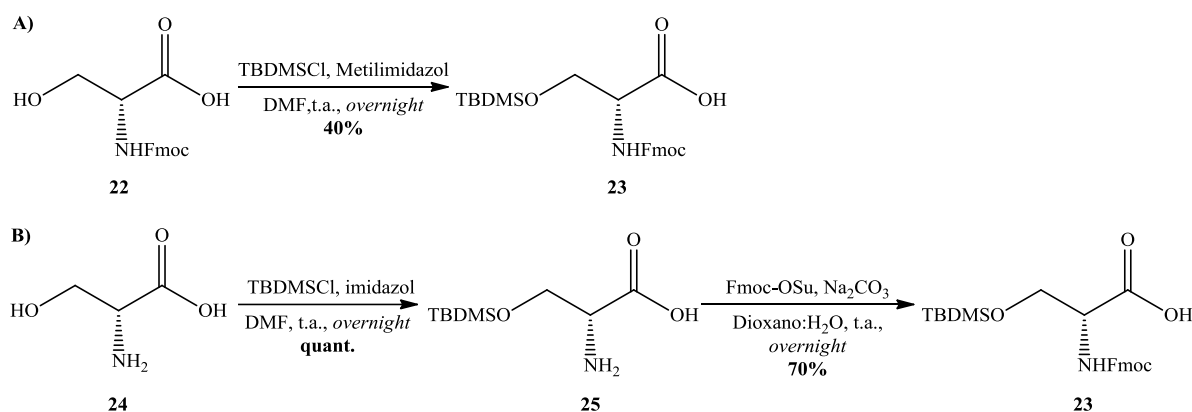
Na síntese em SPFS pretendeu-se obter três péptidos semelhantes onde a única diferença estrutural será o primeiro aminoácido no acoplamento à resina. Os aminoácidos a utilizar são: o natural D-Ala, a Gly, que apresentam uma cadeia alifática e ainda a D-Ser que apresenta um grupo polar não carregado, um grupo hidroxilo que para o método de SPFS pode interferir no processo de síntese e por essa razão deve ser previamente protegido.

Para a protecção do grupo hidroxilo da D-Ser existem vários grupos protectores compatíveis com o método de SPFS (Tabela 2.3). Dentro dos grupos protectores mais adequados para o método, mais propriamente às condições mais suaves de remoção do grupo no fim da síntese e estabilidade nas condições de acoplamento dos restantes aminoácidos, surgiu o TBDMS como uma opção viável.

Tabela 2.3 Grupos protectores do grupo hidroxilo da serina pelo método de Sheppard.²¹

Grupos protectores	Condições de clivagem
 tBu	90% v/v TFA, 30min.
 Tr(R ¹ =H) Cl _t (R ¹ =Cl)	1-5% TFA em DCM, 2-5min.
 TBDMS	0,1M TBAF em DMF, 15min. ou TFA, 15min.

Foram utilizados dois processos de protecção com TBDMSCl, um deles com protecção directa do hidroxilo do material de partida Fmoc-D-Ser-OH compreendendo um só passo (Esquema 2.17-A), e outro em que se usou como material de partida a D-Ser-OH compreendendo dois passos, primeiro a *O*-silação e de seguida a protecção da amina com o grupo Fmoc (Esquema 2.17-B).



Esquema 2.17 Processos de obtenção do produto 24. Em A) protecção directa do hidroxilo do material de partida Fmoc-D-Ser-OH e em B) utilizando de D-Ser-OH como material de partida compreendendo dois passos.

Os ésteres de trimetilsililo são muito susceptíveis a solvólise e logo não são adequados para proteger grupos reactivos de forma permanente. O TBDMSCl é um bom agente de sililação para protecção de grupos hidroxilos, reage lentamente e os rendimentos não são muito elevados. A utilização de imidazol ou metilimidazole como catalisador pode levar a melhores rendimentos.⁵¹

Pelo processo A (Esquema 2.17) a presença de metilimidazol compromete a estabilidade do grupo Fmoc no grupo amina do aminoácido existindo perda parcial deste produto pois a protecção com TBDMSCl ocorre mas paralelamente ocorre também uma desprotecção parcial do grupo amina.⁵² Já no processo B (Esquema 2.17) essa perda não se verifica pois a sililação ocorre inicialmente e só depois é que se protege o grupo amina da serina com o grupo Fmoc. Apesar deste último processo ter mais um passo de síntese apresenta um rendimento mais elevado pelo que se utilizou preferencialmente este processo.

Os péptidos acoplados à resina sintetizados foram utilizados para a síntese dos péptidos e muropeptidos.

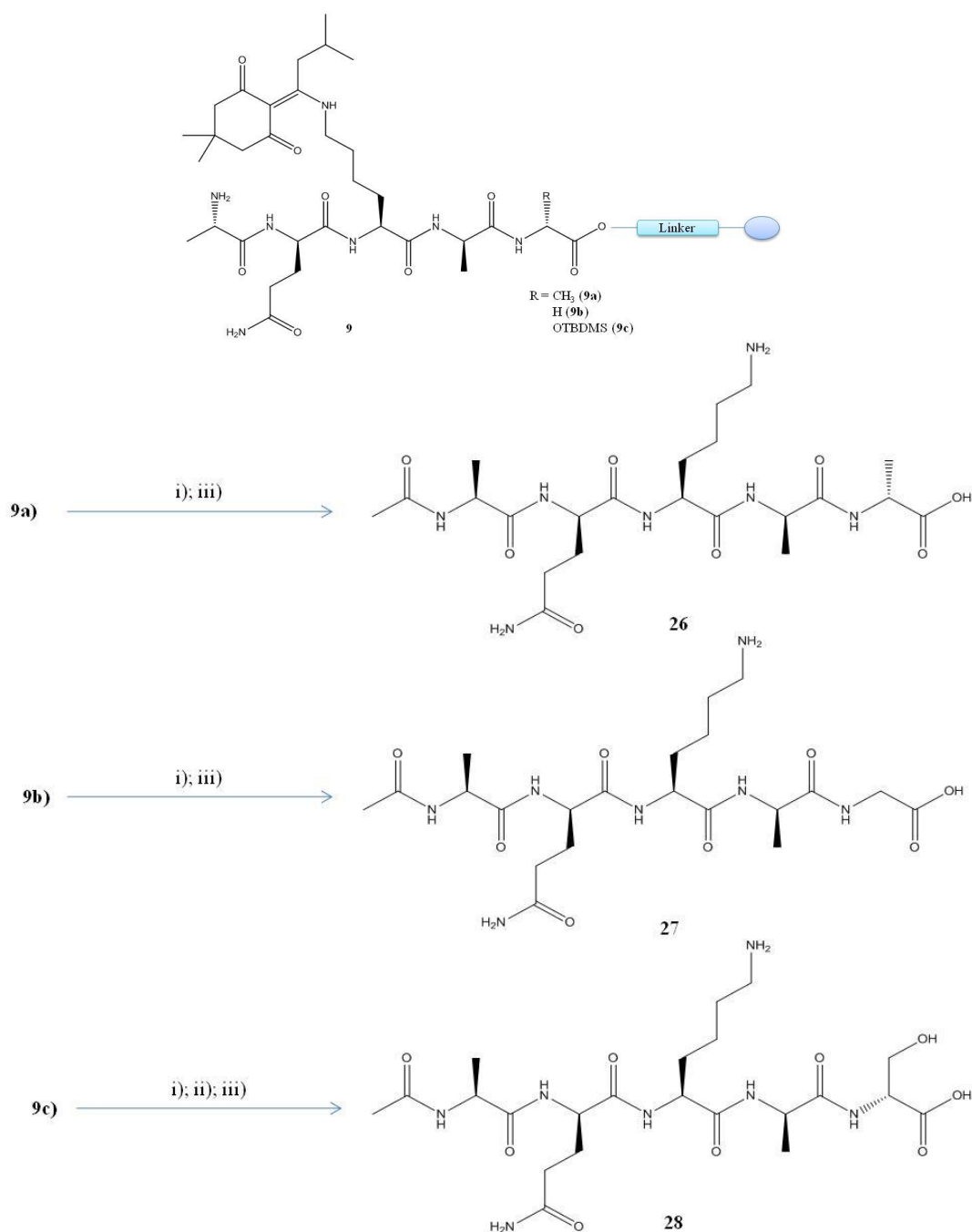
2.5 Síntese dos péptidos

Procedeu-se à acetilação da amina terminal dos péptidos **9a** (terminal D-Ala), **9b** (terminal Gly) e **9c** (terminal D-Ser). A acetilação foi efectuada tendo em conta que na literatura os estudos de interacção com tripéptidos estes estão acetilados no terminal amina.⁸

Para tal utilizou-se condições reaccionais semelhantes à síntese do composto **12** (*N*-acetil-glucosamina): DMAP e anidrido acético em DMF, tendo-se verificado por teste de Kaiser a acetilação. De seguida removeu-se o grupo protector do aminoácido L-Lys com várias lavagens com uma solução de 2% hidrazina em DMF.

No caso do péptido **9c** protegido pelo TBDMS, este grupo terá de ser removido antes da clivagem. Para tal recorreu-se a lavagens com uma solução 0,1M TBAF em DMF.

As condições seguintes para clivagem dos péptidos foram 2% TFA em DCM com várias passagens para garantir o máximo de clivagem de péptido possível. Obtiveram-se assim os péptidos **26**, **27** e **28** (Esquema 2.18).



Esquema 2.18 Síntese dos péptidos com o terminal: D-Ala (26), Gly (27) e D-Ser (28) com acetilação do grupo amina, desprotecção da L-Lys, D-Ser e clivagem da resina. Condições reaccionais i) 1. DMAP, anidrido acético, DMF, t.a., overnight, 2. 2% hidrazina em DMF (10 x 1mL, 10min); ii) 0,1M TBAF em DMF (5 x 1mL, 5min); iii) 2% TFA em DMF (11 x 1mL).

Procedeu-se à purificação por HPLC dos três compostos obtidos, numa coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes duas soluções aquosas: A- 0,1% TFA em 50% ACN e B- 0,1% TFA, utilizando corridas de 20min com um caudal de 3mL/min.

Contudo as amostras não ficaram completamente puras pelo que se repetiu a purificação com outras condições, coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, de modo isocrático como eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

Após os vários processos de purificação não foi possível identificar o produto puro por RMN nas várias fracções recolhidas.

Repetiu-se a síntese dos compostos **26** e **27**, mas por questões de constrangimento de tempo não foi possível repetir a síntese do composto **28**. Após nova preparação de **26** e **27**, a purificação destes compostos foi realizada por c.c.p. RP18 tendo como eluente 10% H₂O em MeOH.⁴⁷ Desta forma foi possível purificar os compostos e de seguida caracterizá-los.

2.5.1 Péptido *N*-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (**26**)

Na Figura 2.4 é possível observar os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC, inicialmente com a coluna Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6 x 100 (B). Apenas a banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida à purificação seguinte, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 3,18min.

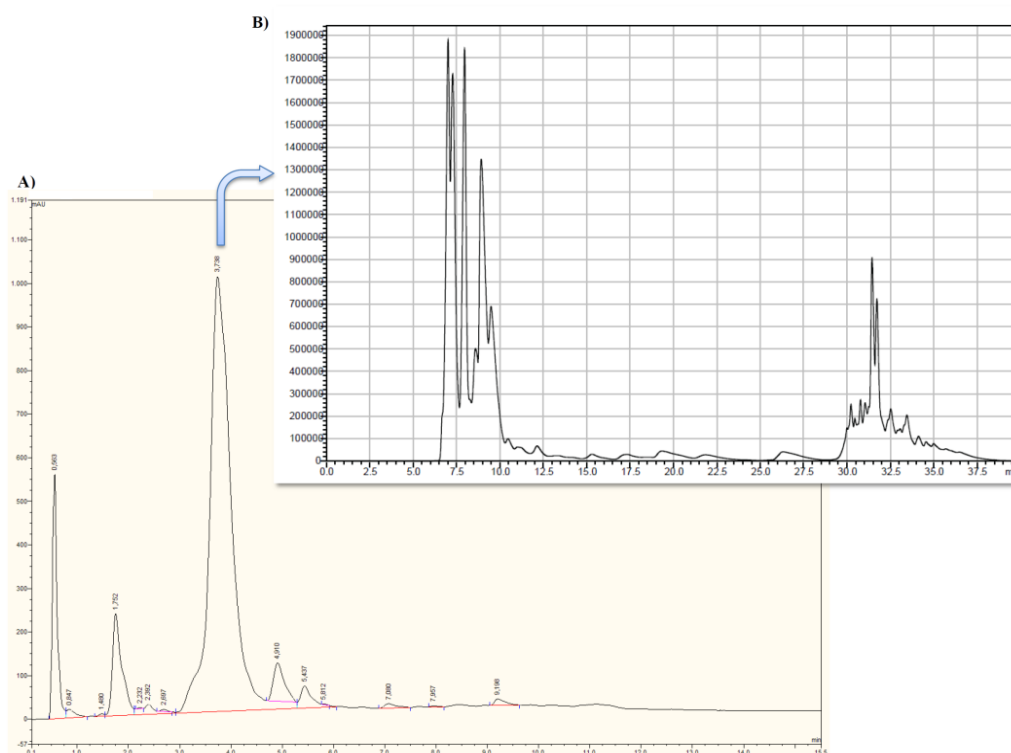


Figura 2.4 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto **26**. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluenteuma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

O péptido **26** foi caracterizado por ¹H-RMN, COSY, TOCSY e NOESY.

Nos espectros de RMN, a atribuição foi feita recorrendo às experiências de COSY e TOCSY. A sobreposição destes espectros permite a detectar a interação entre os prótons do grupo NH de cada aminoácido e o próton α do respectivo aminoácido, através de um pico cruzado. A partir da identificação deste sinal verifica-se a que aminoácido pertence através dos sinais da cadeia lateral, que

estão correlacionados através do espectro de TOCSY (linha vertical). Cada aminoácido produz um padrão de sinais que representam a rede se spins acoplados nesse aminoácido.⁵³

O espectro de NOESY permite obter a sequência do péptido, por correlações inter-resíduos (relação espacial). A sobreposição do espectro TOCSY e NOESY permite identificar as correlações entre os prótons do grupo NH de um aminoácido com o próton α do aminoácido seguinte (Figura 2.5).

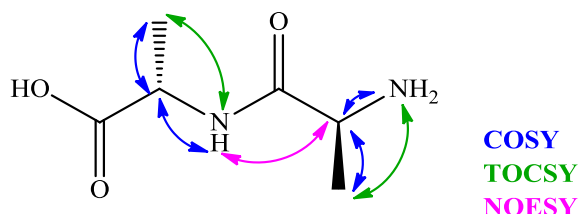


Figura 2.5 Correlações existentes nas experiências de COSY (azul), TOCSY (verde) e NOESY (rosa) num dipéptido exemplo, D-Ala-D-Ala.

Na Figura 2.6 pode-se observar uma expansão dos espectros de COSY e TOCSY onde se pode observar a atribuição efectuada dos prótons α e da atribuição feita dentro de cada resíduo.

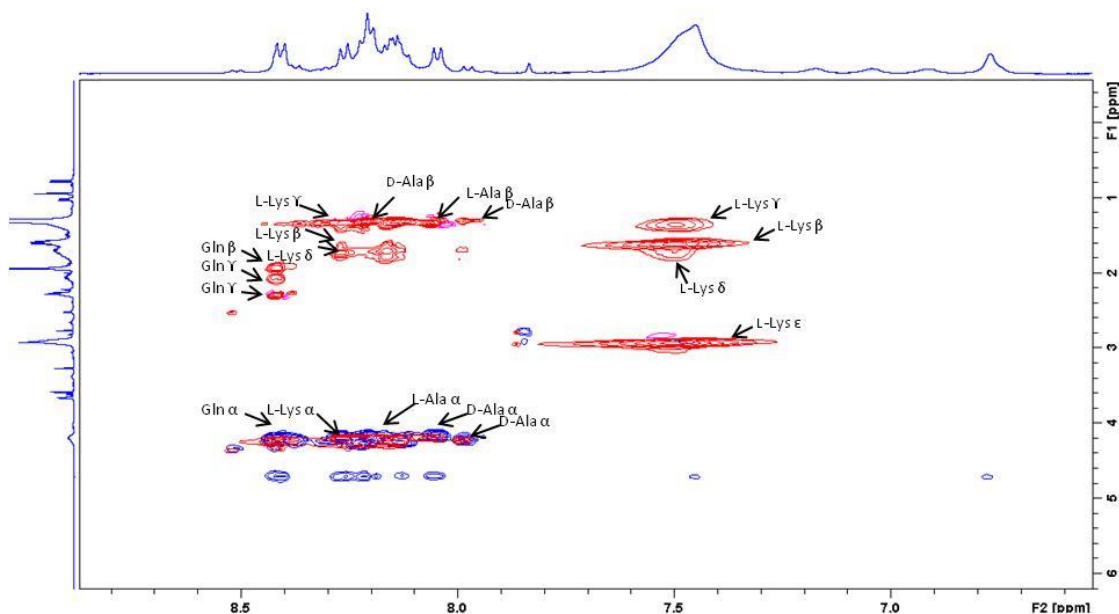


Figura 2.6 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do péptido 26, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 6 a 0,3ppm entre e F2 8,8 a 6,6ppm.

A L-Lys apresenta dois sinais de correlação na expansão apresentada na Figura 2.6 e 2.7. Estes picos cruzados devem-se à correlação entre o NH e próton α , e a correlação entre o NH da cadeia lateral com os prótons ϵ . Desta forma obtêm-se dos sinais a 8,35 e 7,58ppm respectivamente (TOCSY).

Na D-Gln observa-se a correlação entre o próton NH e o próton α a 8,50ppm. Fazendo um traço vertical é possível observar a correlação com os prótons da cadeia lateral: D-Gln-HY, D-Gln-HY' a 2,37 e 2,13ppm e D-Gln-H β a 2,02ppm.

De forma semelhante para as três alaninas, no espectro de TOCSY observam-se os sinais de correlação do próton NH com o próton α que se encontram a 8,14, 8,05 e 8,29ppm (COSY), traçando

uma linha na vertical obtêm-se a correlação com os prótons β a 1,41, 1,38 e 1,39ppm (TOCSY) respectivamente.

Na Figura 2.7 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de TOCSY e NOESY do péptido **26**. A sobreposição apresentada permite obter a sequência correcta de cada aminoácido existente na estrutura.

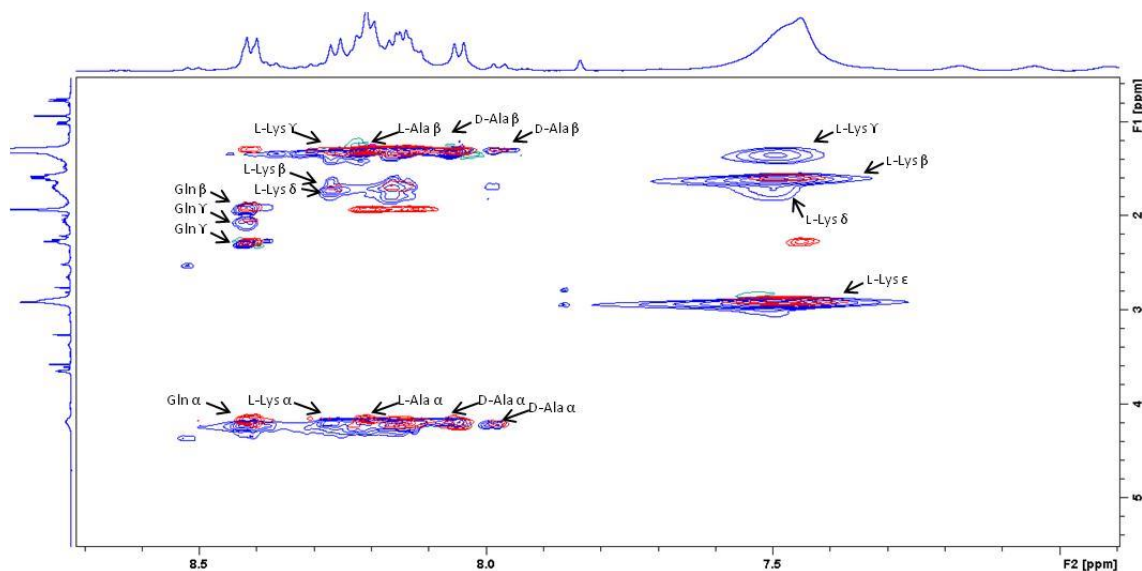


Figura 2.7 Sobreposição dos espectros de TOCSY (azul) e NOESY (vermelho) do péptido **26**, solvente 10% de D_2O em H_2O a 298K e 80ms. Expansão em F1 5,4 e 0,6ppm entre e F2 8,7 e 6,9ppm.

Para distinguir as alaninas e confirmar a sequência verifica-se pelo espectro de NOESY a correlação entre NH de um resíduo da cadeia peptídica e o próton α do resíduo seguinte. A sequência foi verificada estando de acordo com a esperada (*N*-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala **26**).

Os sinais atribuídos encontram-se resumidos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Desvios químicos observados no espectro 1H -RMN do péptido **26**.

	1H -RMN (ppm)		1H -RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,50	L-Lys-H δ'	4,29
D-Gln-H α	4,31	L-Lys-NH	8,35
D-Gln-H γ'	2,37	L-Lys-NH $_2$	7,58
D-Gln-H γ''	2,13	D-Ala 2 -NH	8,14
D-Gln-H β	2,02	D-Ala 2 -H α	4,27
D-Gln-NH $_2$	6,85	D-Ala 2 -H β	1,41
D-Gln-NH $_2$	7,54	D-Ala 1 -NH	8,05
L-Lys-H ϵ	3,01	D-Ala 1 -H α	4,28
L-Lys-H β	1,80	D-Ala 1 -H β	1,38
L-Lys-H δ	1,69	L-Ala-NH	8,29
L-Lys-H γ'	1,43	L-Ala-H α	4,28
L-Lys-H α	1,41	L-Ala-H β	1,39
L-Lys-H β'	1,71	Acetilo CH $_3$	2,03
L-Lys-H γ''	1,81		

2.5.2 Péptido *N*-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys- D-Ala-Gly (27)

Na Figura 2.8 é possível observar os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC descritas anteriormente, inicialmente na coluna Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6 x 100 (B). Apenas a banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida a uma nova purificação, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 0,68min.

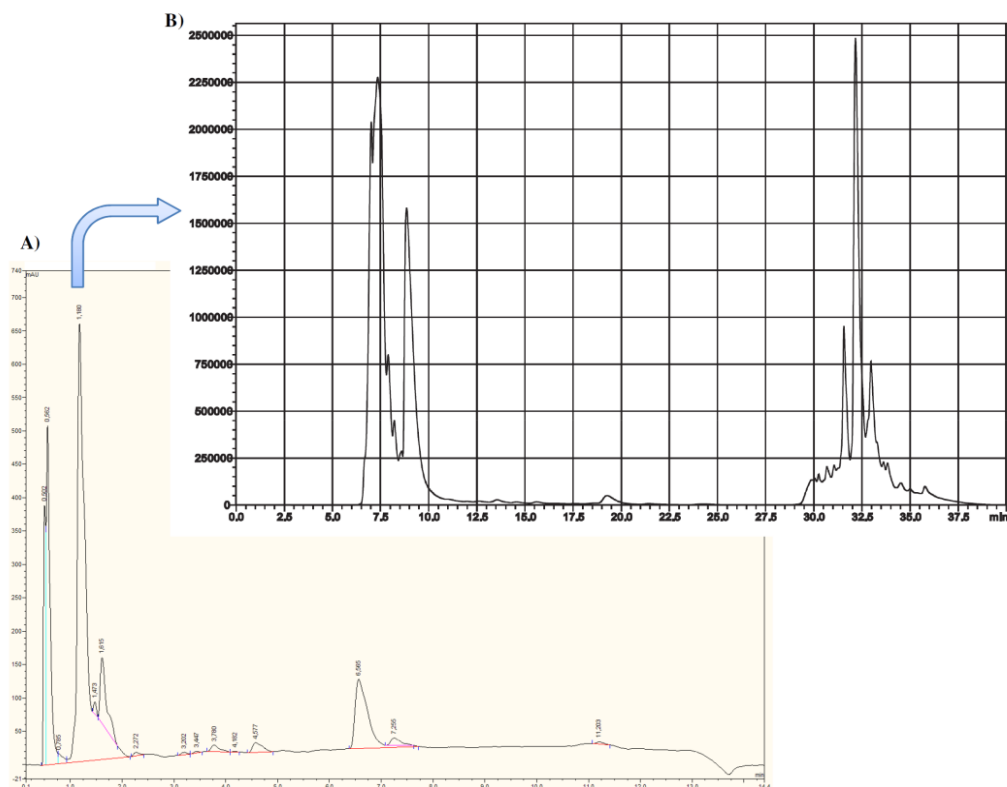


Figura 2.8 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 27. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

Procedeu-se à caracterização do péptido **27** por ^1H -RMN, COSY, TOCSY e NOESY. Como já foi referido anteriormente, a sobreposição dos espectros de COSY e TOCSY permitem a interpretação entre os prótons do grupo NH e o próton α do respectivo aminoácido, Figura 2.9.

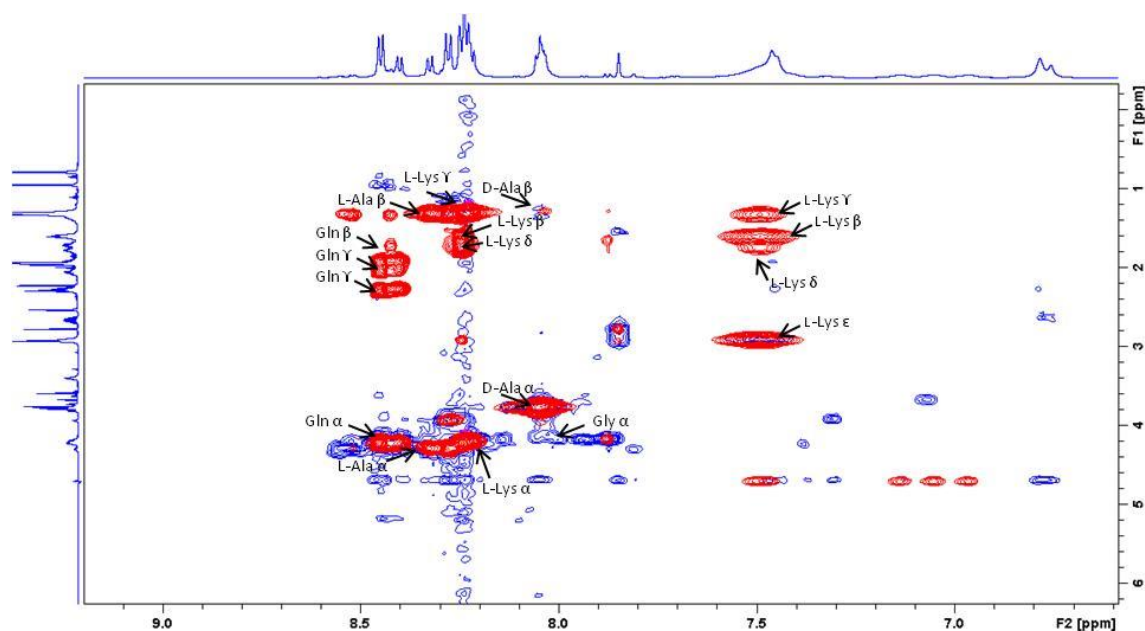


Figura 2.9 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do péptido 27, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 6 a 0,3ppm entre e F2 9,1 a 6,6ppm.

Já a sobreposição do espectro TOCSY e NOESY permite obter a sequenciação, através da interpretação dos sinais de correlação entre os prótons do grupo NH de um aminoácido com o próton α do aminoácido seguinte.

Na Figura 2.10 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de TOCSY e NOESY do péptido 27. A sobreposição apresentada permite obter a sequência correcta de cada aminoácido existente na estrutura.

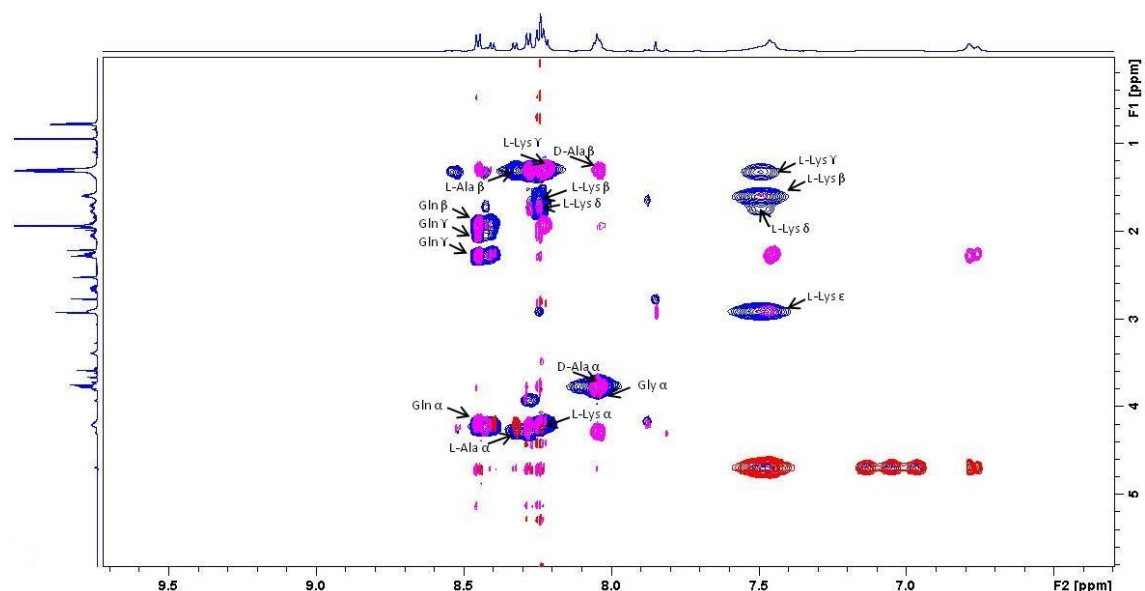


Figura 2.10 Sobreposição dos espectros de TOCSY (azul) e NOESY (rosa) do péptido 27, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 5,6 e 0,2ppm entre e F2 9,7 e 6,3ppm.

Para a Gly utilizou-se o espectro de COSY para a identificação da interação do próton NH da cadeia principal com os prótons α , e o pico cruzado foi observado a 8,12ppm. A Gly é o único resíduo com sinal correspondente nos espectros de TOCSY e COSY, e uma vez que não possui cadeia lateral não apresenta mais sinais no espectro de TOCSY.

Na Figura 2.10 pode encontrar-se uma expansão dos espectros de TOCSY e NOESY, onde foi possível fazer a atribuição dos sinais da L-Lys. A existência de dois sinais a 8,33 e 7,58ppm deve-se à correlação entre os NH e o próton α e os prótons do grupo NH_2 da cadeia lateral e o próton ϵ , (COSY).

Para a D-Gln observa-se a correlação entre o próton NH da cadeia principal e o próton α a 8,53ppm, e os prótons da cadeia lateral: D-Gln-H γ , D-Gln-H γ' a 2,58 e 2,38ppm e D-Gln-H β a 2,03ppm (TOCSY).

De forma semelhante ao péptido **26** para as duas alaninas, os sinais de correlação do próton NH e o próton α (COSY) que se encontram a 8,13 e 8,41ppm, traçando uma linha na vertical obtêm-se a correlação com os prótons β a 1,37 e 1,40ppm (TOCSY) respectivamente para cada alanina.

Para distinguir as alaninas e atribuir qual das duas seria o isômero D- e L-Ala verificou-se a sequência pelo espectro de NOESY a correlação entre NH de um resíduo da cadeia e o próton α do resíduo seguinte. A sequência foi verificada estando de acordo com a esperada (N-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys- D-Ala-Gly **27**) sendo que a alanina a 8,13ppm trata-se do isômero D e a 8,41ppm trata-se do isômero L.

Os sinais atribuídos encontram-se resumidos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Desvios químicos observados no espectro ^1H -RMN do péptido **27**.

	^1H -RMN (ppm)		^1H -RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,53	L-Lys-H γ'	1,70
D-Gln-H α	4,31	L-Lys-H δ	3,01
D-Gln-H β	2,03	L-Lys-H δ'	3,02
D-Gln-H γ	2,38	L-Lys-H ϵ	4,22
D-Gln-H γ'	2,58	L-Ala-NH	8,41
D-Gln-NH $_2$	7,54	L-Ala-H α	4,38
D-Gln-NH $_2'$	6,87	L-Ala-H β	1,40
L-Lys-NH $_2$	7,58	D-Ala-NH	8,13
L-Lys-NH	8,33	D-Ala-H α	3,86
L-Lys-H α	4,29	D-Ala-H β	1,37
L-Lys-H β	1,40	Gly-NH	8,12
L-Lys-H β'	1,42	Gly-H α	3,87
L-Lys-H γ	1,82	Acetilo CH $_3$	2,08

2.5.3 Péptido *N*-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ser (28)

Apesar de não se ter conseguido preparar o péptido **28** em quantidade suficiente a fim de se proceder à sua caracterização, encontram-se na Figura 2.11 os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC descritas anteriormente, inicialmente Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6 x 100 (B). Apenas a banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida à purificação seguinte, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 0,58min.

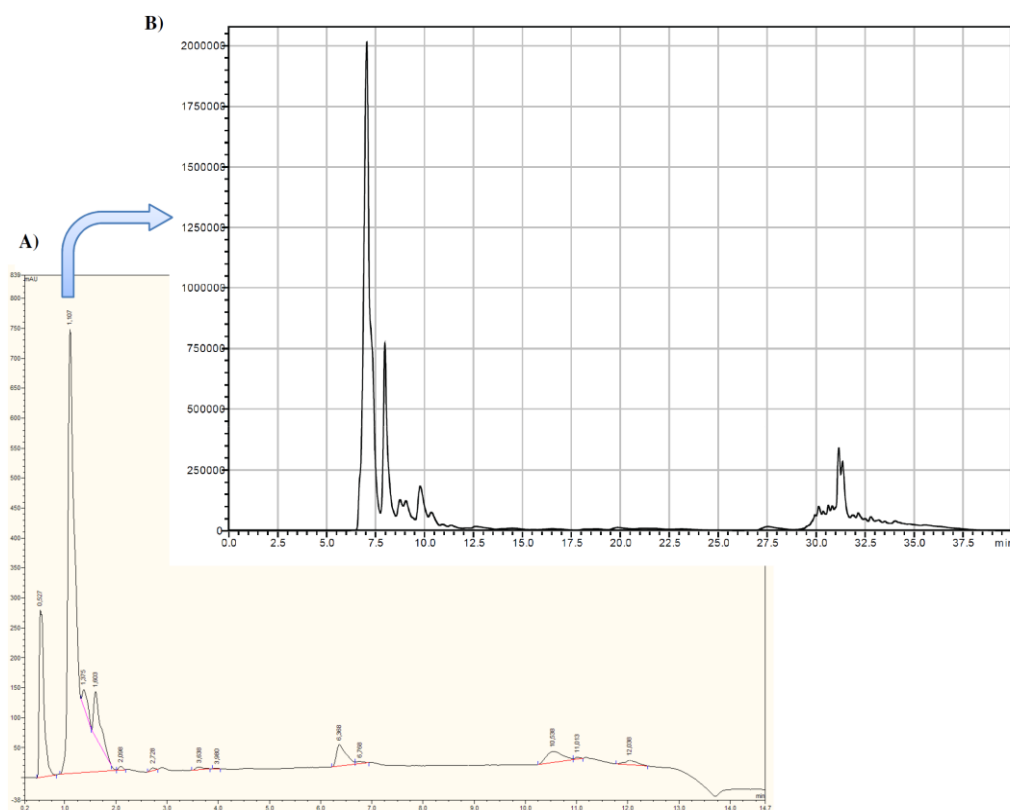


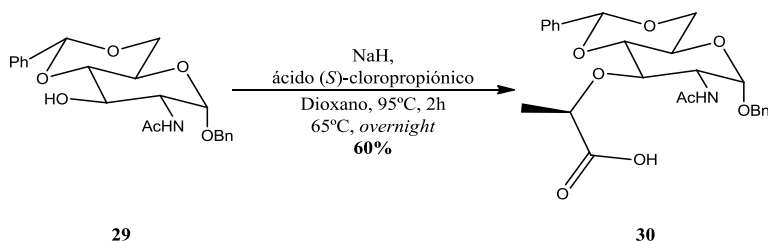
Figura 2.11 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto **28**. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes duas soluções aquosas: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

2.6 Síntese dos muropéptidos

A síntese dos muropéptidos pretendidos passa pelo acoplamento da unidade MurNAc protegida (**8**) e dos péptidos (**9**) preparados pelo método SPFS, ainda acoplados à resina. Quanto à unidade MurNAc, apesar de se ter conseguido sintetizar o composto pretendido (**8**), a quantidade obtida não foi a suficiente para se proceder ao acoplamento com os péptidos preparados e ligados às resinas respectivas.

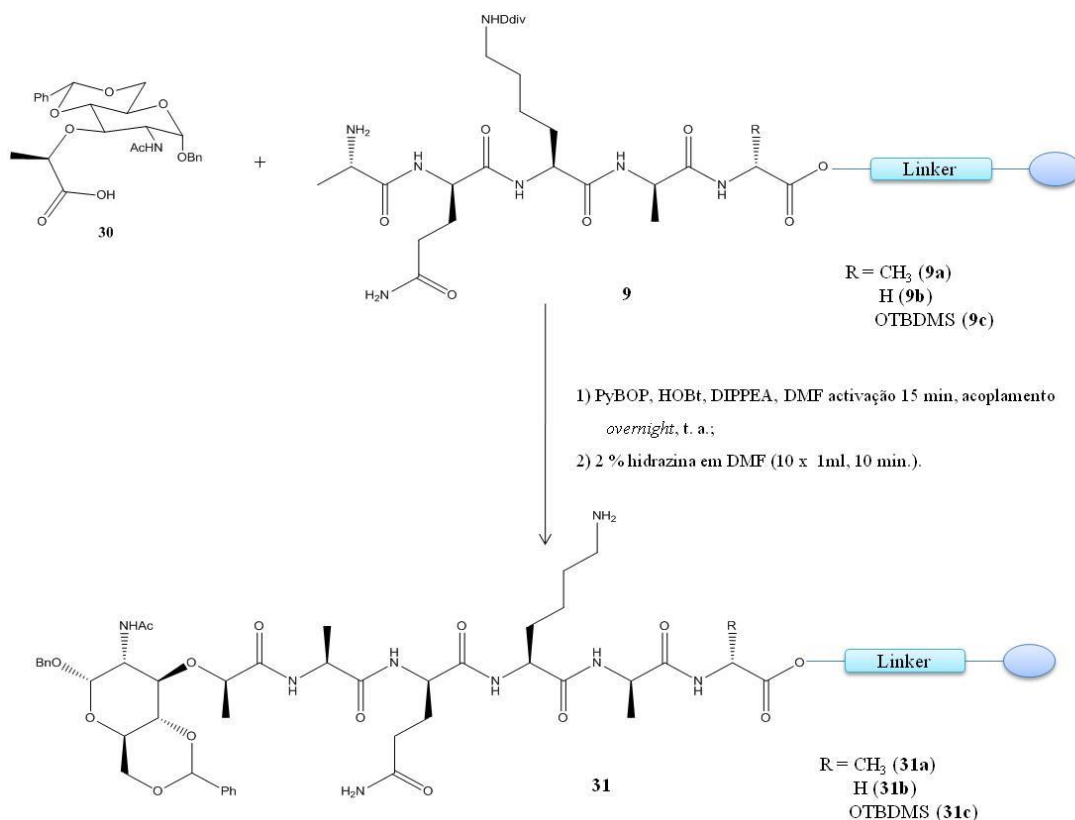
Desta forma, e devido a limitações de tempo, para a preparação dos muropéptidos utilizou-se o composto (**30**), disponível comercialmente, a partir de um derivado comercial (**29**), Esquema 2.19.¹⁷ Este intermediário **30** possui um grupo benzilo na posição anomérica, que é removido por reacção de hidrogenação numa fase avançada da síntese. A opção inicial de explorar o uso do grupo alilo prendeu-se com o facto de este ser removido, após isomerização, por tratamento com ácido simultaneamente

com a remoção do muropéptido da resina. Contudo por constrangimento de tempo optou-se por usar o composto **30**.



Esquema 2.19 Esquema sintético utilizado na síntese do composto **30**.

A activação do ácido carboxílico de composto **28** foi efectuada utilizando o protocolo já descrito para activação dos aminoácidos, ou seja, com os seguintes reagentes: PyBOP, HOBT e DIPEA em DMF. Durante os 15min de activação a solução adquiria uma consistência de gel, dificultando a transferência para a resina. Tendo-se utilizado um excesso de reagentes (aproximadamente 6equiv), o acoplamento não foi comprometido. Após verificar pelo teste de Kaiser que o acoplamento tinha ocorrido com sucesso, procedeu-se à desproteção do grupo amina da cadeia lateral da L-Lys por tratamento com uma solução a 2% hidrazina em DMF, para remoção do grupo Ddiv (Esquema 2.20).



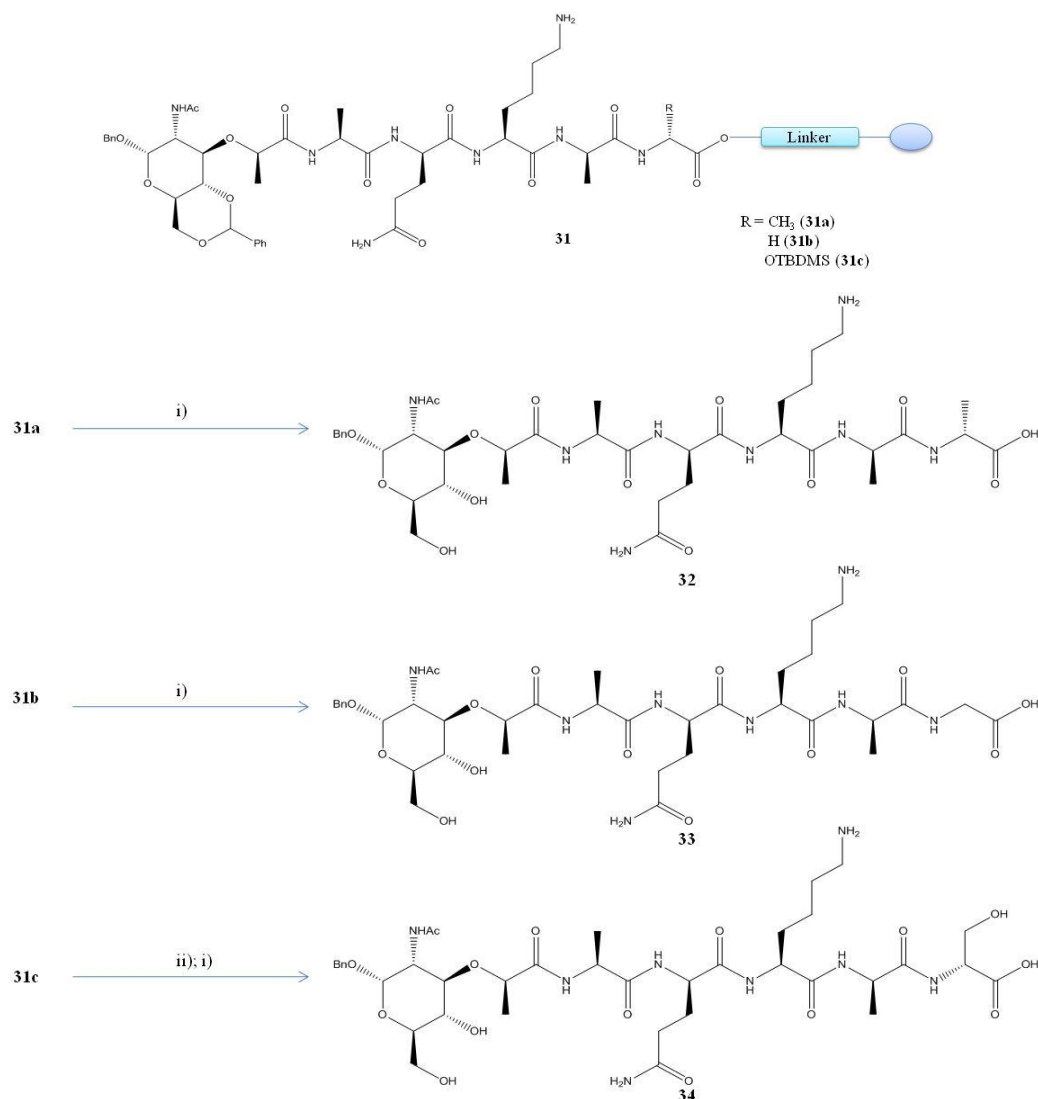
Esquema 2.20 Síntese do composto **31** via pelo acoplamento do composto **30** com **9** seguido de remoção do grupo Ddiv da cadeia lateral da L-Lys.

Com a cadeia lateral da L-Lys desprotegida e o acoplamento da unidade MurNAc protegida procedeu-se à clivagem dos muropéptidos da resina com condições ácidas, realizando diversas lavagens com uma solução de 2% TFA em DCM. A única exceção para este procedimento foi realizada para o

muro péptido utilizando a D-Ser como primeiro aminoácido (**31c**). Pois como referido anteriormente a cadeia lateral deste aminoácido contém um grupo hidroxilo foi protegido com o grupo TBDMS, e a sua remoção é efectuada por tratamento com uma solução de 0,1M TBAF em DMF.

Uma vantagem da utilização do acetal de benzilideno para protecção das posições *O*-4 e *O*-6 da unidade MurNAc é o facto de este grupo ser removido em condições ácidas, utilizadas na clivagem do muro péptido da resina.

Desta forma obtiveram-se os três muro péptidos, os quais diferem no aminoácido terminal da cadeia peptídica, a D-Ala (**32**), a Gly (**33**) e a D-Ser (**34**) (Esquema 2.21).



Esquema 2.21 Síntese dos muro péptidos com o terminal: D-Ala (**32**), Gly (**33**) e D-Ser (**34**) a partir do composto **31**. As condições reaccionais: i) 2% TFA em DCM (11 x 1mL) e ii) 0,1M TBAF em DMF, (5 x 1mL) (5 x 5min).

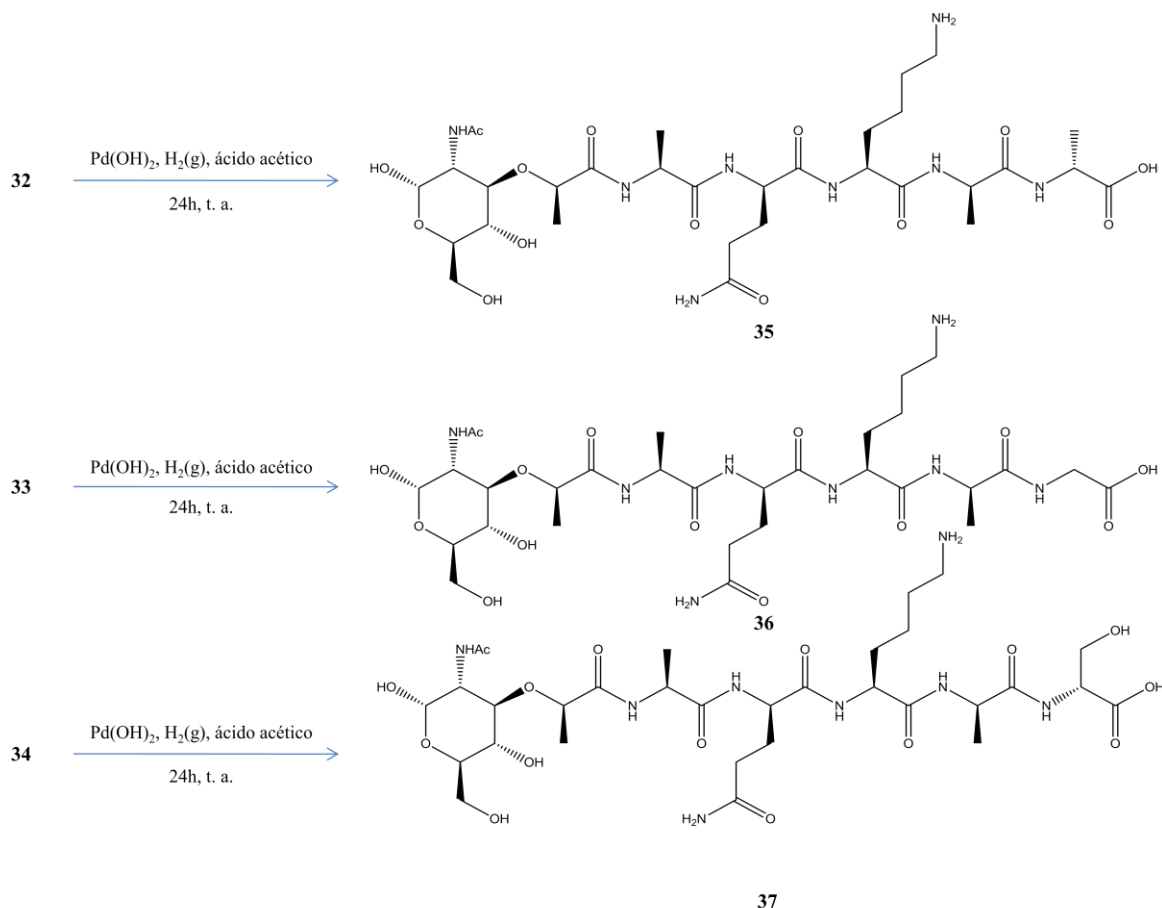
De seguida procedeu-se à purificação por HPLC dos três compostos obtidos à semelhança do procedimento efectuado para os péptidos **26**, **27** e **28**. A análise de HPLC foi efectuada numa coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, com um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min.

Contudo as amostras não ficaram puras, tendo ocorrido co-eluição de picos, pelo que se repetiu a purificação com outras condições, coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, de modo isocrático com eluente uma solução aquosas de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

Apesar dos vários processos de purificação não foi possível identificar o produto por RMN nas várias fracções recolhidas.

Os muropéptidos **32**, **33** e **34**, foram então sintetizados de novo e purificados por c.c.p. RP18 tendo como eluente 10% H₂O em MeOH. Desta forma foi possível purificar os compostos e de seguida proceder-se à sua caracterização.⁴⁷

Após a caracterização das estruturas procedeu-se à remoção do grupo benzilo que ainda se mantinha na posição anomérica. Para tal recorreu-se à hidrogenação dos muropéptidos recorrendo ao tratamento das amostras com Pd(OH)₂ sob carvão em ácido acético numa atmosfera de hidrogénio gasoso.⁴⁷ Por constrangimento de tempo o muropéptido **34** foi hidrogenado contudo não foi possível proceder à sua caracterização como efectuado nos outros dois muropéptidos (**32** e **33**) (Esquema 2.22).



Esquema 2.22 Esquema de síntese dos muropéptidos hidrogenados D-Ala (**35**), Gly (**36**) e D-Ser (**37**).

No processo de hidrogenação para além da formação do produto ocorreu a formação de um gel, que dificultou o processo de purificação da amostra.

2.6.1 Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (35)

Na Figura 2.12 é possível observar os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC descritas anteriormente, inicialmente na coluna Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith RP8e 4.6 x 100 (B). A banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida a uma nova purificação, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 0,33min.

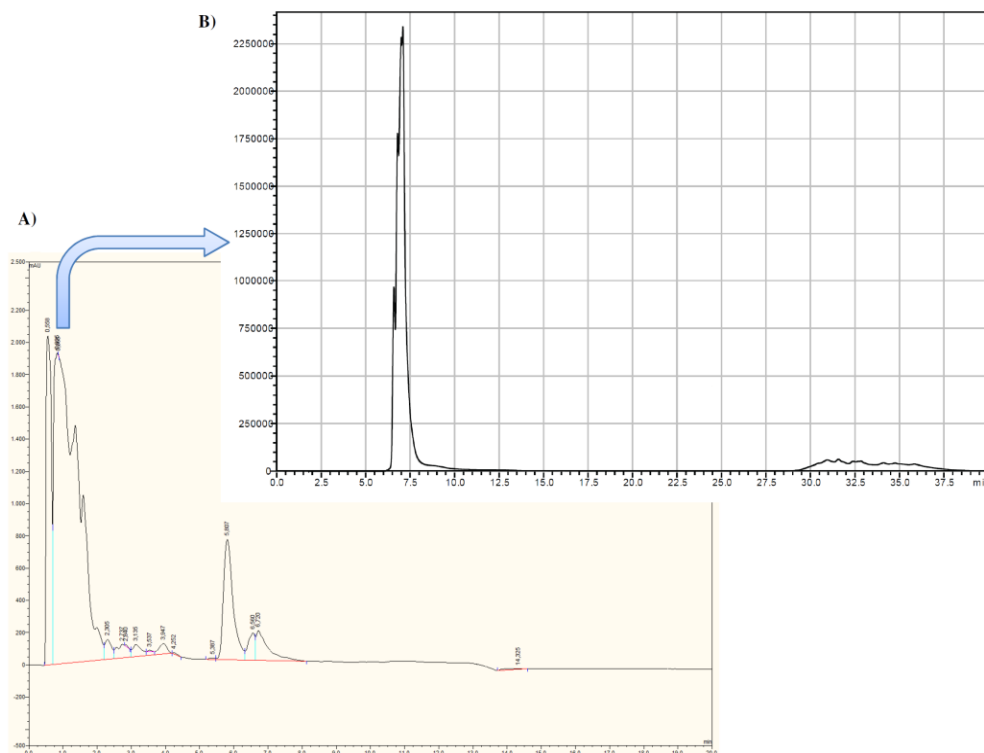


Figura 2.12 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 32. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min

Com o muropéptido **32** purificado procedeu-se à sua caracterização por ^1H -RMN, COSY, TOCSY e NOESY.

Na Figura 2.13 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de COSY e TOCSY do muropéptido **32**.

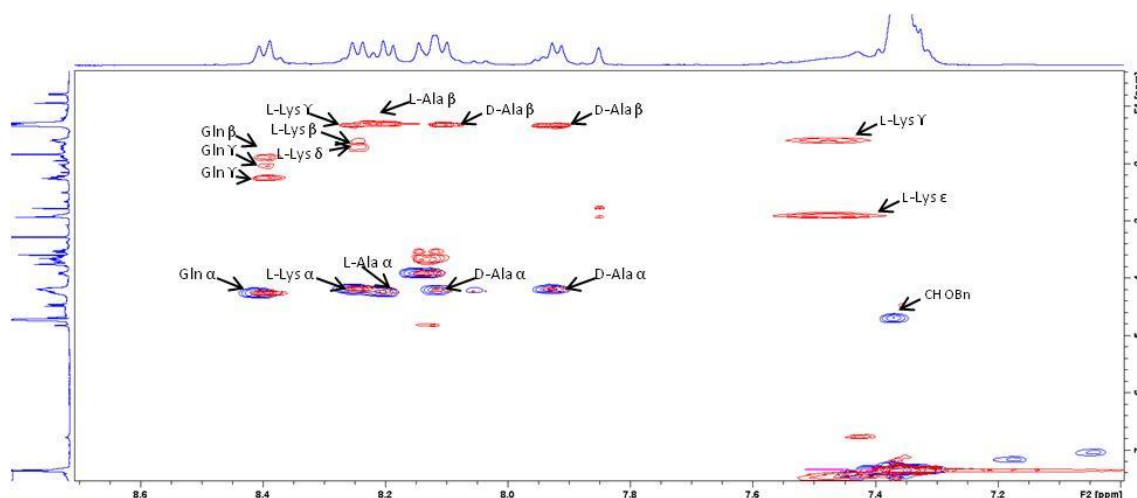


Figura 2.13 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido **32**, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 7,4 a 0,4 ppm entre e F2 8,5 a 7,0ppm.

Da mesma forma que a descrita anteriormente para a caracterização do péptido **32** por RMN, foi possível observar três alaninas através dos sinais de correlação do próton NH com o próton α (COSY) que se encontram a 8,16, 7,98 e 8,26ppm (para cada alanina), traçando uma linha na vertical obtêm-se a correlação com os prótons β a 1,38, 1,39 e 1,36ppm (no espectro de TOCSY), respectivamente.

Os sinais de correlação da L-Lys são também observados na expansão apresentada na Figura 2.13, onde se verificam as correlações entre os NH e o próton α (COSY) e entre os prótons do grupo NH₂ da cadeia lateral e os prótons ϵ (COSY) a 8,31 e 7,54ppm, respectivamente. Na expansão do espectro de TOCSY (Figura 2.13) podem observar-se as correlações entre o próton NH e os prótons da cadeia lateral: L-Lys-H β a 1,66 e 1,65 ppm, L-Lys-H γ a 1,39 e 1,43 ppm, L-Lys-H δ a 1,77 e 1,42 ppm e L-Lys-H ϵ 2,97 ppm e também as correlações dos prótons NH₂ com os prótons a 7,54 ppm.

Quanto ao resíduo D-Gln observa-se a correlação entre o próton NH e o próton α a 8,45ppm (COSY) e os prótons da cadeia lateral: D-Gln-H γ , D-Gln-H γ' a 2,09 e 2,31ppm e D-Gln-H β a 1,95ppm (TOCSY).

A 7,42ppm observa-se um sinal de correlação referente aos prótons aromáticos do grupo protector referente à posição anomérica (O-1) e os prótons CH₂ do mesmo grupo. Este sinal é um indicativo adicional ao teste de Kaiser, que confirma o acoplamento da unidade MurNAc protegida (**30**) à cadeia peptídica.

De forma a se poder fazer a atribuição do anel da unidade MurNAc observou-se a 4,88ppm o próton anomérico que correlaciona no espectro de TOCSY com os prótons H-2, H-3, uma correlação um pouco ténue, e este ultimo com o H-4. O próton em H-4 por sua vez correlaciona com os prótons H-5 e H-6, mas a definição do espectro não é suficiente para a distinção entre eles (Figura 2.14).

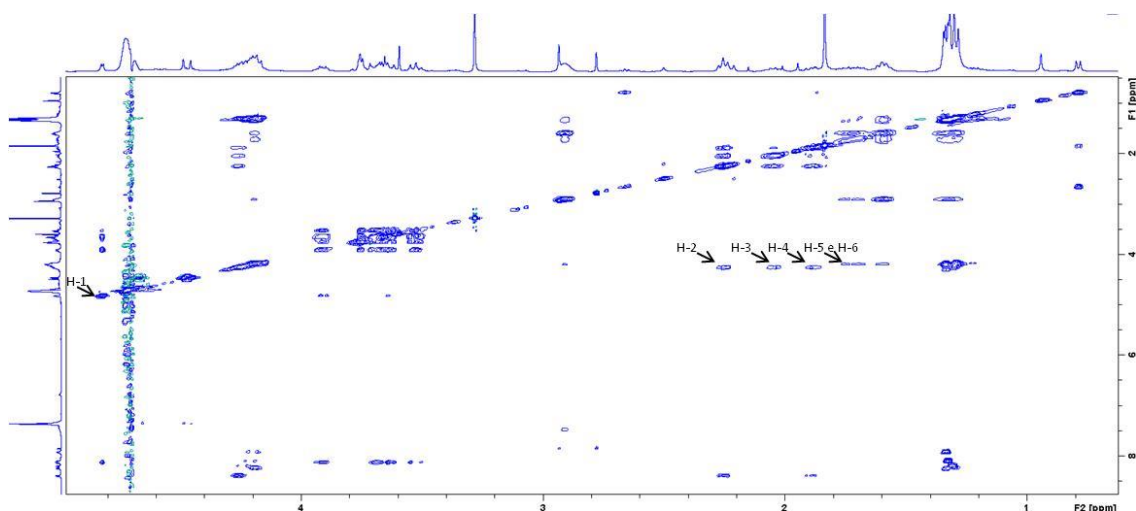


Figura 2.14 Espectros de TOCSY (azul) do muropéptido 32, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 8,5 a 0,5ppm entre e F2 4,8 a 0,6ppm.

Para distinguir as alaninas e atribuir qual das duas seria o isômero D- e L-Ala verificou-se a sequência dos resíduos através do espectro de NOESY, pela observação da correlação entre o próton NH de um resíduo da cadeia e o próton α do resíduo seguinte. A sequência foi verificada estando de acordo com a esperada (MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala **32**), sendo que as alaninas a 8,16 e 7,98ppm correspondem ao isômero D e a 8,26ppm corresponde ao isômero L.

Os sinais atribuídos encontram-se resumidos na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 Desvios químicos observados no espectro ¹H-RMN do muropéptido 32.

	¹ H-RMN (ppm)		¹ H-RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,45	D-Ala ² -H β	1,38
D-Gln-H α	4,32	D-Ala ¹ -NH	7,98
D-Gln-H β	1,95	D-Ala ¹ -H α	4,24
D-Gln-HY'	2,09	D-Ala ¹ -H β	1,39
D-Gln-HY''	2,31	L-Ala-NH	8,26
D-Gln-NH ₂ e NH ₂ '	*	L-Ala-H α	4,30
L-Lys-NH ₂	7,54	L-Ala-H β	1,36
L-Lys-NH	8,31	MurNAcH-1	4,88
L-Lys-H α	4,25	MurNAcH-2	3,92
L-Lys-H β	1,66	MurNAcH-3	3,89
L-Lys-H β '	1,65	MurNAcH-5 e H-6	3,63
L-Lys-HY'	1,39	MurNAcH-4	3,66
L-Lys-HY''	1,43	MurNAcCH OBn	7,42
L-Lys-H δ	1,77	MurNAcCH ₂ OBn	4,76
L-Lys-H δ '	1,42	MurNAc NH	*
L-Lys-H ϵ	2,97	MurNAc Acetilo CH ₃	1,83
D-Ala ² -NH	8,16	H α lactato	*
D-Ala ² -H α	4,26	H β lactato	*

* Não foi possível atribuir.

O muropéptido **32** foi hidrogenado contudo por questões de tempo não foi possível proceder à sua caracterização.

2.6.2 Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly (**36**)

Na Figura 2.15 é possível observar os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC descritas anteriormente, inicialmente na coluna Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6 x 100 (B). A banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida a uma nova purificação, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 0,47min.

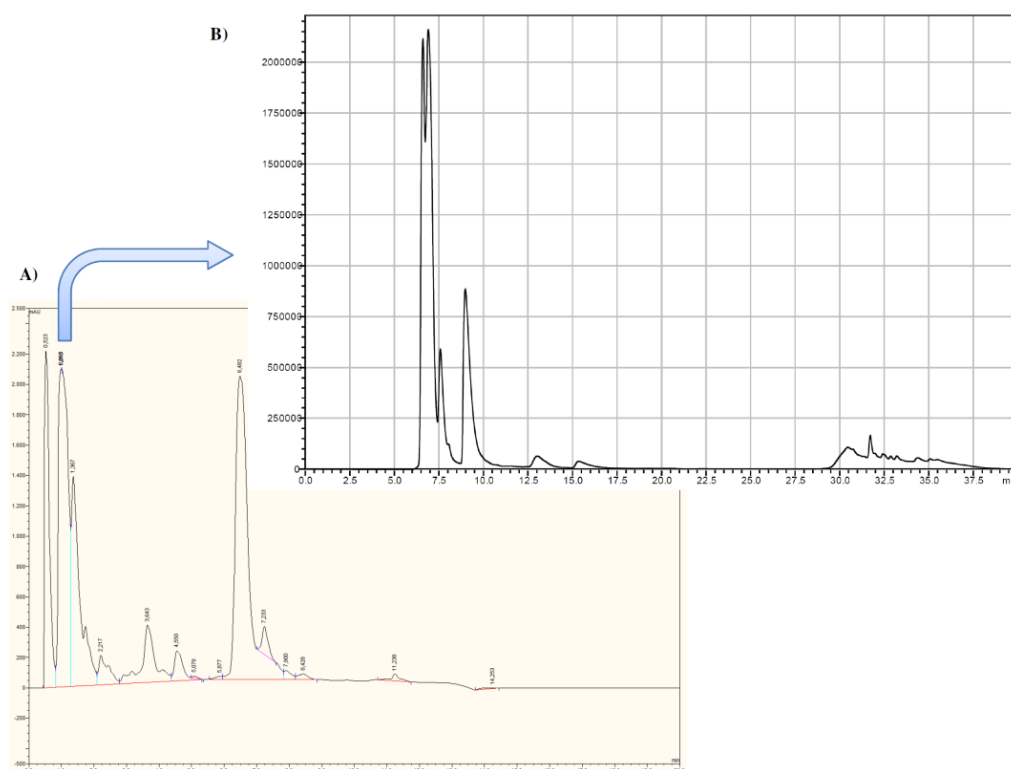


Figura 2.15 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto **33**. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

O muropéptido **33** purificado foi caracterizado por ^1H -RMN, COSY, TOCSY e NOESY.

Na Figura 2.16 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de COSY e TOCSY do muropéptido **33**. Esta sobreposição permite observar a presença de cada aminoácido existente na estrutura. A maioria da atribuição dentro do mesmo resíduo foi feita pelo espectro de TOCSY traçando uma recta do sinal do protão α verificados no espectro de COSY.

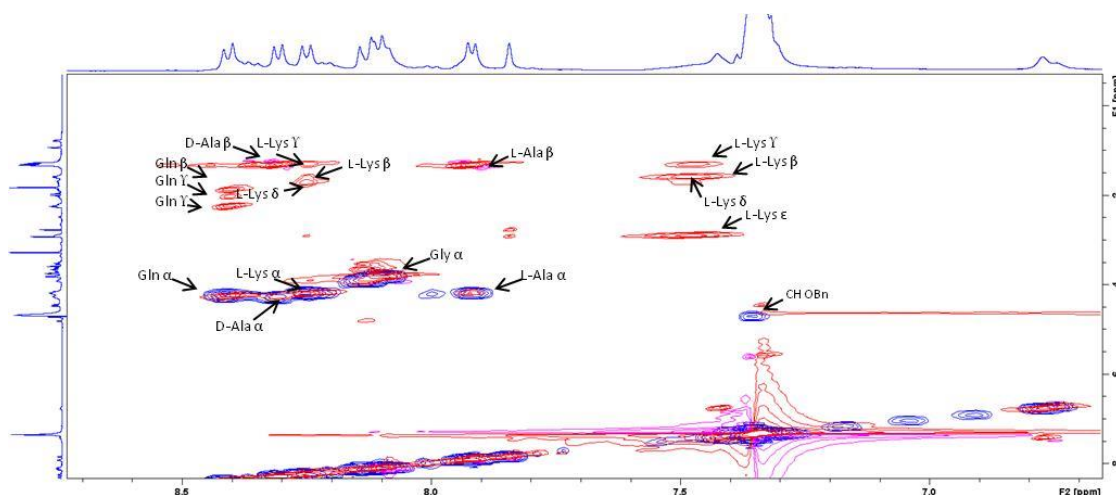


Figura 2.16 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 33, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 8,2 a 0,6ppm entre e F2 8,7 a 6,7ppm.

Da mesma forma que a descrita anteriormente para o péptido **27** os sinais de correlação da L-Lys presentes na expansão apresentada dois sinais devido à correlação entre o próton NH e o próton α , e entre os prótons NH₂ e o próton ϵ , encontram-se a 8,32 e 7,55ppm, respectivamente. A D-Gln foi confirmada pela observação da correlação entre o próton NH e próton α a 8,47ppm (COSY), e entre os prótons da cadeia lateral: D-Gln-HY, D-Gln-HY' a 2,08 e 2,30ppm e D-Gln-H β a 1,94ppm (TOCSY).

Quanto às duas alaninas presentes na estrutura, os sinais de correlação do próton NH com o próton α , encontram-se a 7,99 e 8,38ppm (COSY), para cada alanina, e traçando uma linha na vertical obteve-se a correlação com os prótons β a 1,39, e 1,37ppm (TOCSY), respectivamente.

Tendo em conta que o espectro de NOESY não apresentava definição suficiente para a identificação da sequência da cadeia e consequentemente a identificação do isómero D- e L-Ala comparou-se os sinais obtidos com a caracterização feita anteriormente do péptido **27**.

A 7,42ppm observa-se um sinal de correlação referente aos prótons aromáticos do grupo protector referente à posição anomérica (O-1) e os prótons do grupo metileno do grupo benzilo. De forma a fazer a atribuição do anel da unidade MurNAc, observou-se a 4,88ppm o sinal correspondente ao próton anomérico que correlaciona no espectro de TOCSY com os prótons H-2, H-3 ténue, e este último com o H-4. O próton em H-4 por sua vez correlaciona com os prótons H-5 e H-6, mas a definição do espectro não é suficiente para a distinção entre eles (Figura 2.17).

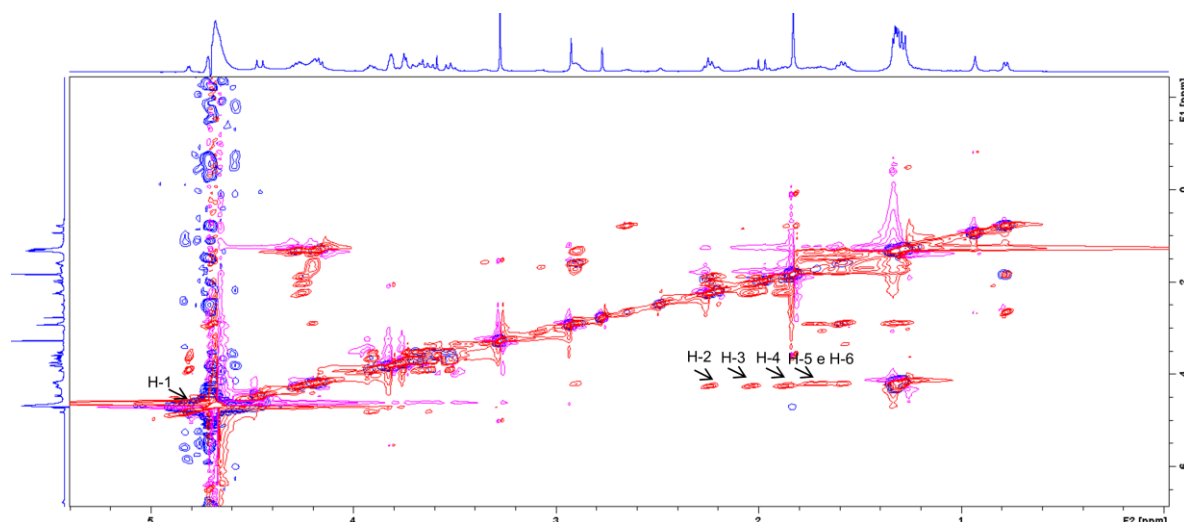


Figura 2.17 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido 33, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 6,5 a -1ppm entre e F2 6,4 a 0ppm.

A sequência foi verificada estando de acordo com a esperada (MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly **33**) sendo que a alanina a 7,99ppm correspondendo ao isômero D e a 8,38ppm ao isômero L.

Os sinais atribuídos encontram-se resumidos na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 Desvios químicos observados no espectro ¹H-RMN do muropéptido 33.

	¹ H-RMN (ppm)		¹ H-RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,47	D-Ala-NH	7,99
D-Gln-H α	4,31	D-Ala-H α	4,25
D-Gln-H β	1,94	D-Ala-H β	1,39
D-Gln-HY'	2,08	L-Ala-NH	8,38
D-Gln-HY''	2,30	L-Ala-H α	4,31
D-Gln-NH ₂ e NH ₂ '	*	L-Ala-H β	1,37
L-Lys-NH ₂	7,55	MurNAcH-1	4,88
L-Lys-NH	8,32	MurNAcH-2	3,97
L-Lys-H α	4,27	MurNAcH-3	3,71
L-Lys-H β	1,77	MurNAcH-5, H-6 e H-4	*
L-Lys-H β '	1,65	MurNAcCH OBn	7,42
L-Lys-HY	1,37	MurNAcCH ₂ OBn	4,77
L-Lys-HY'	1,36	MurNAcacetilo CH ₃	1,89
L-Lys-H δ	2,96	MurNAc NH	*
L-Lys-H δ '	2,97	H α lactato	*
L-Lys-H ϵ	4,27	H β lactato	*
Gly-NH	8,20		
Gly-H α	3,92		

* Não foi possível atribuir.

O muropéptido **33** foi hidrogenado, como já referido anteriormente, tendo-se procedido à sua caracterização por ^1H -RMN, COSY, TOCSY e NOESY.

Na Figura 2.18 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de COSY e TOCSY do muropéptido **36**, produto da hidrogenação do muropéptido **33**. Esta sobreposição permite observar a presença de cada aminoácido existente na estrutura. A maioria da atribuição dentro do mesmo resíduo foi feita pelo espectro de TOCSY traçando uma recta do sinal do protão α verificados no espectro de COSY.

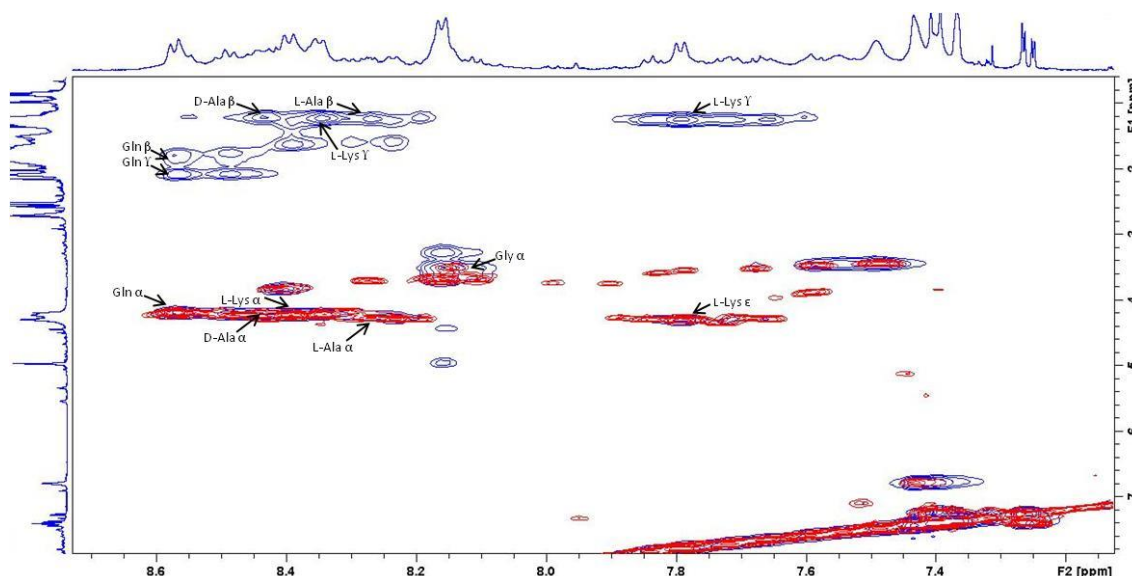


Figura 2.18 Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido **36**, solvente DMSO-d_6 a 298K e 80ms. Expansão em F1 7,8 a 0,8ppm entre e F2 8,7 a 7,2ppm.

De forma semelhante ao muropéptido **33** os sinais de correlação da L-Lys presentes na expansão apresentada dois sinais devido à correlação entre o protão NH e o protão α , e entre os protões NH_2 e o protão ϵ , encontram-se a 8,39 e 7,78ppm, respectivamente. A D-Gln foi confirmada pela observação da correlação entre o protão NH e protão α a 8,56ppm (COSY), e entre os protões da cadeia lateral: D-Gln-H γ a 2,07ppm e D-Gln-H β a 1,77 ppm (TOCSY).

Quanto às duas alaninas presentes na estrutura, os sinais de correlação do protão NH com o protão α , encontram-se a 8,43 e 8,34ppm (COSY), para cada alanina, e traçando uma linha na vertical obteve-se a correlação com os protões β a 1,20 e 1,22ppm (TOCSY), respectivamente.

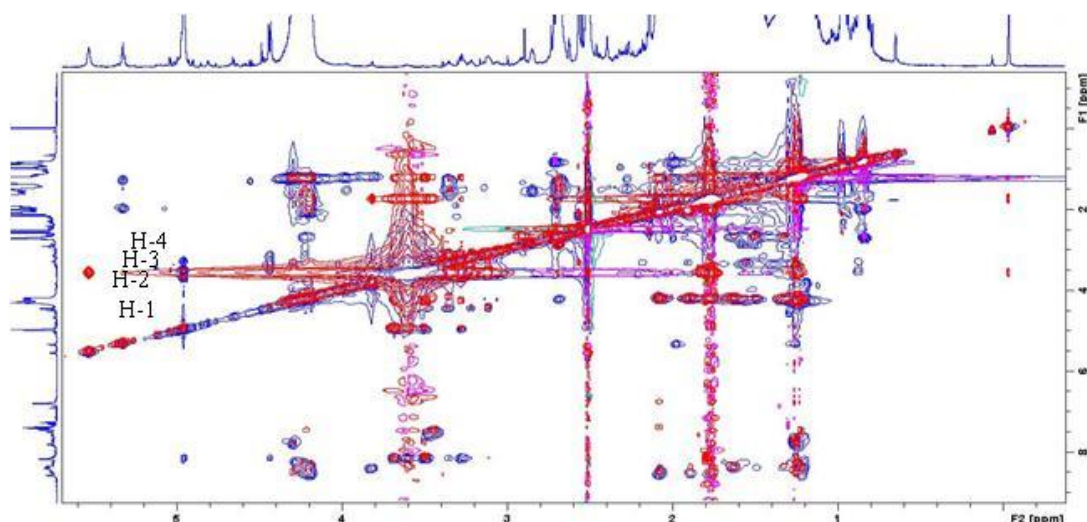


Figura 2.19 Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido 36, solvente DMSO- d_6 a 298K e 80ms. Expansão em F1 7,8 a 0,8ppm entre e F2 8,7 a 7,2ppm.

Na Figura 2.19 encontra-se uma expansão da sobreposição do espectro de COSY e TOCSY do muropéptido **36**. A 4,95ppm observa-se um sinal de correlação referente ao próton referente à posição anomérica H-1 que se correlaciona no espectro de TOCSY com os prótons H-2, H-3 e H-4. O próton em H-4 por sua vez correlaciona com os prótons H-5 e H-6, mas a definição do espectro não é suficiente para a distinção entre eles.

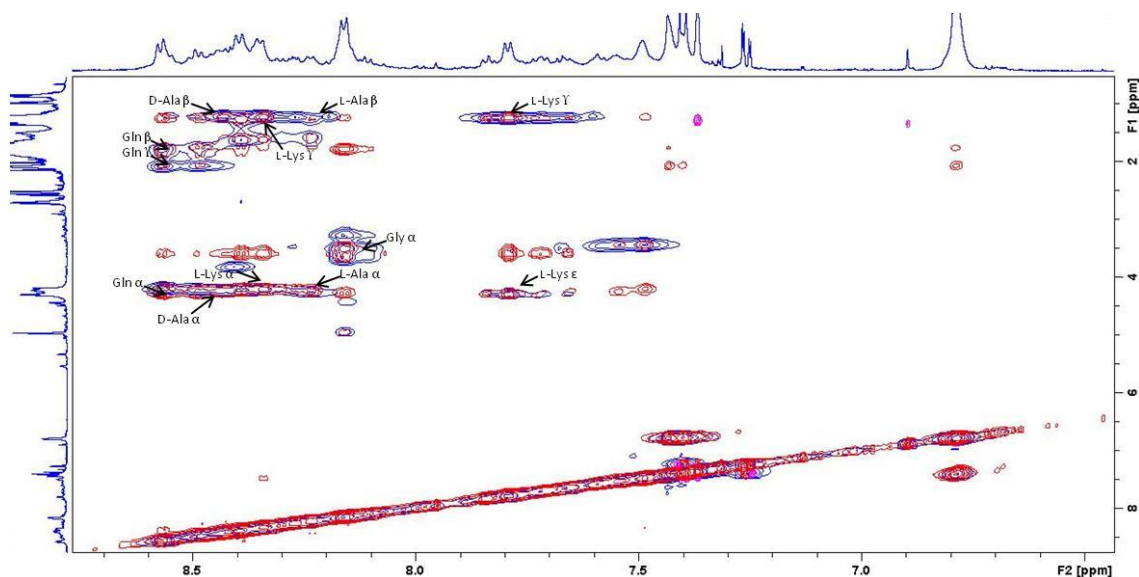


Figura 2.20 Sobreposição dos espectros de NOESY (vermelho) e TOCSY (azul) do muropéptido 36, solvente DMSO- d_6 a 298K e 80ms. Expansão em F1 8,5 a 1,0ppm entre e F2 8,7 a 6,5ppm.

Tendo em conta que a sobreposição dos espectros de NOESY e TOCSY (Figura 2.20) foi possível identificar o isómero D- e L-Ala, a 8,43ppm o isómero D e a 8,34ppm o isómero L.

Visto que não foi observado prótons referentes ao grupo protector que se encontrava na posição anomérica antes da hidrogenação pode-se concluir que esta foi bem sucedida.

Na Tabela 2.8 encontram-se a comparação entre os sinais obtidos do produto não hidrogenado (**33**) e o produto de hidrogenação (**36**).

Tabela 2.8 Desvios químicos observados no espectro ^1H -RMN do muropéptido 33 e do muropéptido 36.

Muropéptido 33	^1H -RMN (ppm)	Muropéptido 36	^1H -RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,47	D-Gln-NH	8,56
D-Gln-H α	4,31	D-Gln-H α	4,19
D-Gln-H β	1,94	D-Gln-H β	1,77
D-Gln-HY'	2,08	D-Gln-HY'	*
D-Gln-HY''	2,30	D-Gln-HY''	2,07
D-Gln-NH ₂ e NH ₂ '	*	D-Gln-NH ₂ e NH ₂ '	*
L-Lys-NH ₂	7,55	L-Lys-NH ₂	7,78
L-Lys-NH	8,32	L-Lys-NH	8,39
L-Lys-H α	4,27	L-Lys-H α	4,22
L-Lys-H β	1,77	L-Lys-H β	1,27
L-Lys-H β '	1,65	L-Lys-H β '	1,24
L-Lys-HY'	1,37	L-Lys-HY'	1,01
L-Lys-HY''	1,36	L-Lys-HY''	1,04
L-Lys-H δ	2,96	L-Lys-H δ	1,62
L-Lys-H δ '	2,97	L-Lys-H δ '	1,57
L-Lys-H ϵ	4,27	L-Lys-H ϵ	4,29
Gly-NH	8,20	Gly-NH	8,15
Gly-H α	3,92	Gly-H α	3,50
D-Ala-NH	7,99	D-Ala-NH	8,43
D-Ala-H α	4,25	D-Ala-H α	4,22
D-Ala-H β	1,39	D-Ala-H β	1,20
L-Ala-NH	8,38	L-Ala-NH	8,34
L-Ala-H α	4,31	L-Ala-H α	4,21
L-Ala-H β	1,37	L-Ala-H β	1,22
MurNAc H-1	4,88	MurNAc H-1	4,95
MurNAc H-2	3,97	MurNAc H-2	3,67
MurNAc H-3	3,71	MurNAc H-3	3,50
MurNAc H-5, H-6 e H-4	*	MurNAc H-5, H-6	*
MurNAc CH OBn	7,42	MurNAc CH OBn	Não apresenta
MurNAc CH ₂ OBn	4,77	MurNAc CH ₂ OBn	Não apresenta
MurNAc acetilo CH ₃	1,89	MurNAc acetilo CH ₃	*
MurNAc NH	*	MurNAc NH	1,75
H α lactato	*	H α lactato	*
H β lactato	*	H β lactato	*
		MurNAc H-4	3,27

* Não foi possível atribuir.

2.6.3 Muropéptido MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ser (37)

Na Figura 2.21 é possível observar os cromatogramas obtidos nas duas purificações por HPLC descritas anteriormente, inicialmente na coluna Chromolith RP18e (A) e de seguida com a coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6 x 100 (B). A banda assinalada com uma seta azul do cromatograma A foi submetida a uma nova purificação, cromatograma B. Essa região foi escolhida pois obtinha uma maior intensidade, tendo um tempo de retenção de 0,48min.

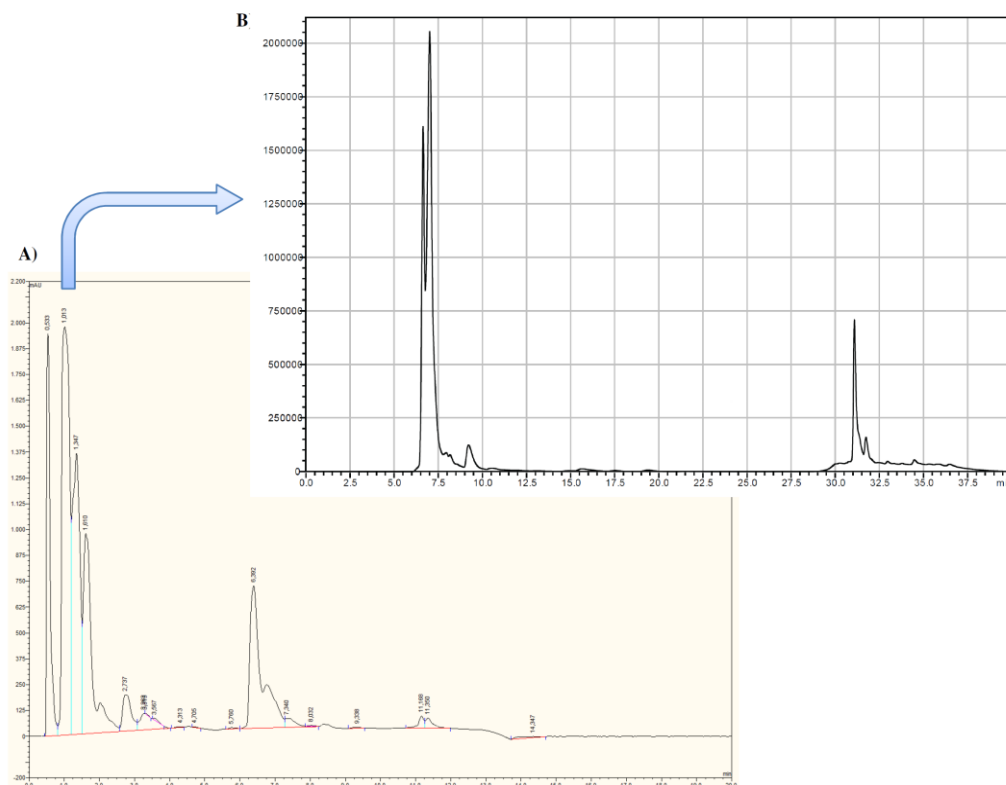


Figura 2.21 Cromatogramas obtidos nas duas purificações efectuadas por HPLC do composto 34. Em A) coluna Chromolith RP18e com detecção a 206nm e 270nm, um gradiente tendo como eluentes: A-0,1% TFA em 50% ACN e B-0,1% TFA, utilizando corridas de 20min e caudal de 3mL/min. A seta azul indica a banda que sofreu nova purificação, B) coluna Chromolith 2 x RP8e 4.6x100 com detecção a 206nm e 270nm, isocrática com eluente uma solução aquosa de 0,01% TFA, utilizando corridas de 40min e caudal de 1mL/min.

O muropéptido **34** purificado foi caracterizado por ^1H -RMN, COSY, TOCSY e NOESY.

Na Figura 2.22 pode-se observar uma expansão da sobreposição dos espectros de COSY e TOCSY do muropéptido **34**. A sobreposição apresentada permite observar a presença de cada aminoácido existente na estrutura apesar de todos os espectros desta amostra terem ficado com fraca resolução foi possível uma atribuição com base em comparação com os muropéptidos **32** e **34**.

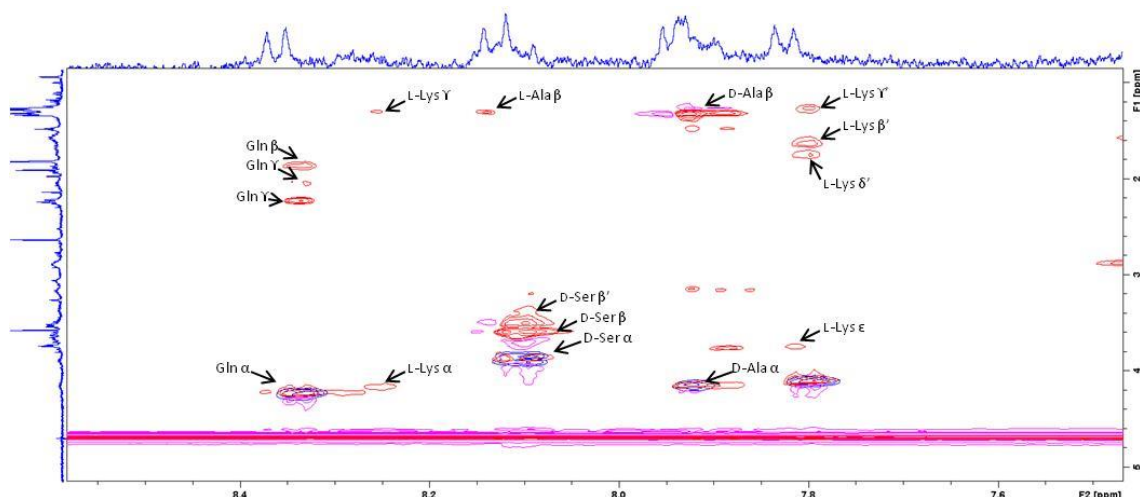


Figura 2.22 Sobreposição dos espectros de COSY (azul) e TOCSY (vermelho) do muropéptido **34**, solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 5,0 a 1,0ppm entre e F2 8,6 a 7,5ppm.

Na expansão apresentada observam-se os sinais da L-Lys pela presença da correlação entre o protão NH e o protão α , e entre os protões do grupo NH₂ e os protões ϵ , a 8,38 e 7,94ppm (COSY), respectivamente. Apesar dos sinais deste resíduo não estarem bem definidos nem totalmente representados na expansão, foi possível observá-los por aumento do espectro.

A D-Gln foi identificada pela observação dos sinais da correlação do protão NH com o protão α a 8,47ppm (COSY), e pela corelação dos protões da cadeia lateral: D-Gln-HY', D-Gln-HY'' a 2,35e 2,15ppm e D-Gln-H β a 1,98ppm (TOCSY).

Quanto às duas alaninas presentes na estrutura foram identificadas pelos sinais da correlação do protão NH com o protão α que se encontram a 8,05 e 8,32ppm, e traçando uma linha na vertical obteve-se a correlação com os protões β a 1,44 e 1,41ppm (TOCS), respectivamente.

O resíduo D-Ser verificou-se a correlação entre os protões NH e o protão α 8,22ppm no espectro de COSY e pelo espectro de TOCSY a correlação com os protões da cadeia lateral protões β a 3,72 e 3,64ppm.

A 7,45ppm observa-se um sinal de correlação referente aos protões aromáticos do grupo benzilo e os protões do grupo metilenodo mesmo grupo. De forma a atribuir a estrutura do anel da unidade MurNAc, sobrepôs-se os espectros de TOCSY dos muropéptidos **32** e **34**. Desta forma foi possível verificar que a região dos sinais referentes ao anel da unidade MurNAc é bastante contactável (Figura 2.23).

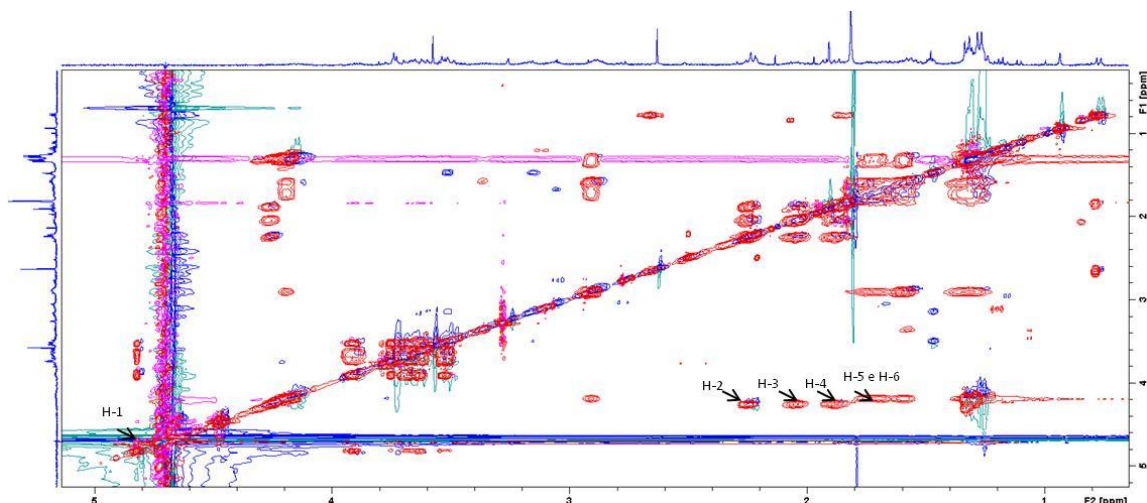


Figura 2.23 Sobreposição dos espectros de TOCYS do muropéptido 34 (azul) e TOCYS do muropéptido 32 (vermelho), solvente 10% de D₂O em H₂O a 298K e 80ms. Expansão em F1 5,2 a 0,4ppm entre e F2 5,2 a 0,8ppm.

A sequência foi verificada estando de acordo com a esperada (MurNAc-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ser **34**) sendo que a alanina a 8,05ppm corresponde ao isômero D e a 8,32ppm corresponde ao isômero L.

Os sinais atribuídos encontram-se resumidos na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 Desvios químicos observados no espectro ¹H-RMN do muropéptido 34.

	¹ H-RMN (ppm)		¹ H-RMN (ppm)
D-Gln-NH	8,47	D-Ser-Hβ	3,72
D-Gln-Hα	4,38	D-Ser-Hβ'	3,64
D-Gln-Hβ	1,98	D-Ala-NH	8,05
D-Gln-Hγ	2,35	D-Ala-Hα	4,21
D-Gln-Hγ'	2,15	D-Ala-Hβ	1,44
D-Gln-NH ₂ e NH ₂ '	*	L-Ala-NH	8,32
L-Lys-NH ₂	7,94	L-Ala-Hα	4,32
L-Lys-NH	8,38	L-Ala-Hβ	1,41
L-Lys-Hα	4,36	MurNAcH-1	4,09
L-Lys-Hβ	1,75	MurNAcH-2	3,86
L-Lys-Hβ'	1,70	MurNAcH-3	3,60
L-Lys-Hγ	1,37	MurNAcH-5 e H-6	3,15
L-Lys-Hγ'	1,41	MurNAcH-4	3,48
L-Lys-Hδ	1,86	MurNAcCH OBn	7,45
L-Lys-Hδ'	1,80	MurNAcCH ₂ OBn	4,80
L-Lys-Hε	3,88	MurNAcAcetilo CH ₃	1,91
D-Ser-NH	8,22	MurNAc NH	*
D-Ser-Hα	4,01	Hα lactato	*
		Hβ lactato	*

* Não foi possível atribuir.

O muropéptido **34** foi hidrogenado mas por questões de tempo não foi possível proceder à sua caracterização.

2.7 Estudos de Ressonância Magnética Nuclear

Na literatura os estudos de interação entre a vancomicina e os muropéptidos de PGN não se encontram descritos, sendo que a unidade máxima até agora estudada foram cadeias tripeptídicas.^{6, 8, 9, 36, 39}

Visto que pretendemos proceder ao estudo de interações com uma pequena biblioteca de muropéptidos é de todo o interesse fazer estudos preliminares com os seus constituintes: a unidade MurNac e as cadeias peptídicas respectivas. Para tal procedeu-se ao estudo preliminar de interação entre vancomicina e a unidade MurNac desprotegida, comercialmente disponível.

Preparam-se duas soluções *stock* de vancomicina e MurNac ambas a 2mM em DMSO- d_6 pois sabe-se que nestas condições a vancomicina é solúvel e encontra-se caracterizada na literatura.⁵⁴

Os estudos de interação foram efectuados por ROESY com uma mistura de 1:1,5 vancomicina/MurNac. Na Figura 2.24 encontra-se uma expansão dos espectros de 1H -RMN da vancomicina (azul), MurNac (verde), e mistura dos dois (1:1,5) (vermelho).

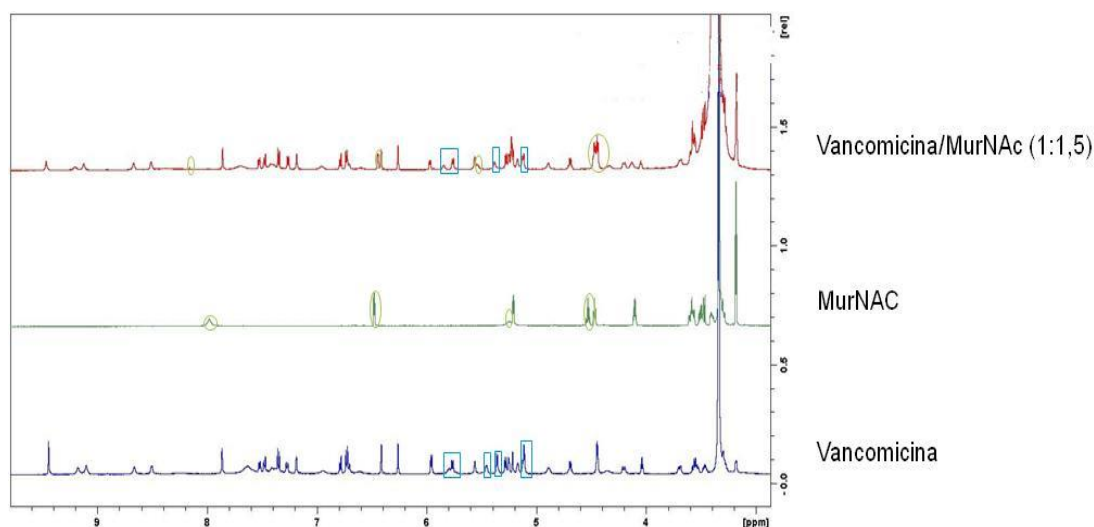
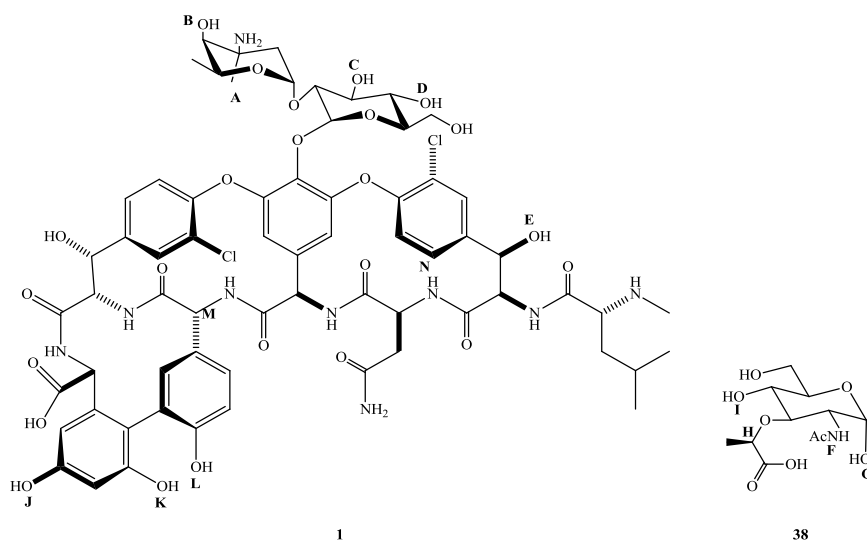


Figura 2.24 Representação de uma expansão de 9,6 a 3,0ppm dos espectros de 1H -RMN da vancomicina (azul), MurNac desprotegido (verde) e de uma mistura 1:1,5 das soluções a 2mM de vancomicina/MurNac (vermelho), solvente DMSO- d_6 a 298K e 80ms.

Na figura 2.24 encontra-se assinalados com circunferências verdes as alterações observadas dos sinais referentes à unidade MurNac no espectro da mistura, num total de quatro sinais que sofreram desvio e com quadrados azuis as alterações observadas dos sinais referentes à vancomicina, num total de quatro sinais que sofreram alteração.

A Tabela 2.10 apresenta um resumo dos sinais assinalados da Figura 2.24 com os seus desvios químicos e a alteração ocorrida quando aos dois compostos se encontram misturados.

Tabela 2.10 Tabela resumo com os sinais de ^1H -RMN que sofreram alteração do desvio químico entre a sua forma pura e o quando em mistura.



Composto puro	Desvios químicos (ppm)	Mistura	Desvios químicos (ppm)
1-A	5,79	1-A	5,84
1-B	5,44	1-B	5,54
1-C	5,35	1-C	5,38
1-D	5,11	1-D	5,13
1-E	5,80	1-E	5,84
38-F	7,99	38-F	6,16
38-G	6,48	38-G	6,44
38-H	4,53	38-H	4,75
38-I	5,25	38-I	5,54

Tendo em conta as alterações observadas nos espectros de ^1H -RMN comparou-se os espectros de ROESY da vancomicina e da mistura obtida (Figura 2.25). Apesar da baixa qualidade que os dois espectros apresentam foi possível observar algumas alterações nas correlações dos sinais. No espectro de ROESY da mistura surgiram novas correlações do protão 1-B com os grupos hidroxilo dos anéis aromáticos da vancomicina (1-J, K e L) e com o protão 1-N do anel aromático a 9,44, 9,18, 9,11 e 7,63ppm, que não existiam no espectro de ROESY da vancomicina isolada. Observou-se também no espectro de ROESY da mistura o desaparecimento de correlações do protão 1-M a 4,48ppm.

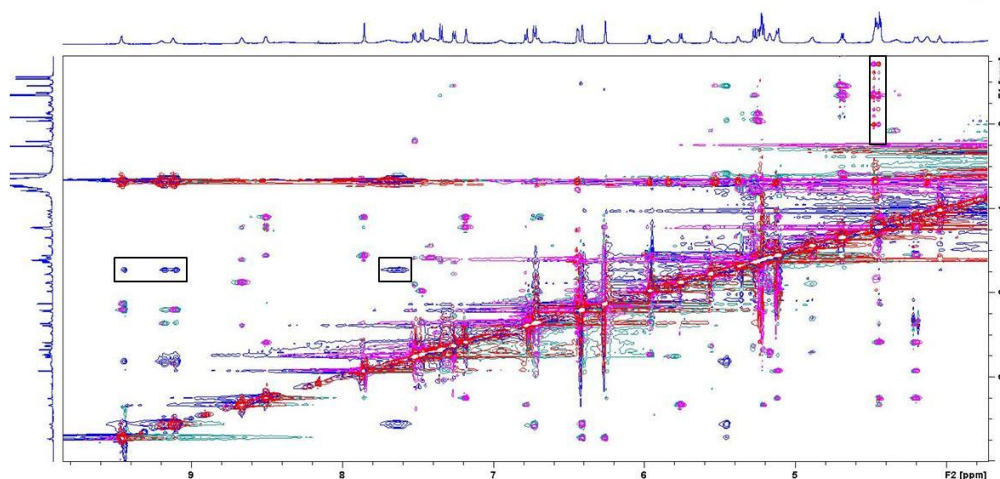


Figura 2.25 Sobreposição dos espectros de ROESY da vancomicina (azul/verde) e do ROESY da mistura (rosa/vermelho), solvente DMSO- d_6 a 298K e 80ms. Expansão F1 8,8 a 0,4ppm e F2 9,8 a 3,8ppm.

Os resultados das experiências de ^1H -RMN e de ROESY sugerem que a presença de MurNAc provo que uma alteração conformacional na vancomicina, por interação com esta unidade. Contudo mais estudos seriam necessários para se poder retirar conclusões mais concretas, através de mais ensaios com diferentes *mixing times* nos espectros de ROESY, bem como fazer o estudo para proporções diferentes da mistura vancomicina/MurNAc. Poder-se-ia proceder a experiências de DOSY que auxiliariam na determinação de novas interações por alteração de difusão da vancomicina e do complexo vancomicina-MurNAc caso haja de facto formação de um complexo.

As alterações dos desvios químicos em MurNAc e na vancomicina observados nos espectros de mistura, mas também das correlações presentes nos espectros de ROESY, indicam que o estudo das interações entre os muropéptidos e a vancomicina poderão trazer novos dados relevantes e ainda não observados na literatura.

Os resultados preliminares obtidos com estes estudos mostram um caminho promissor para o melhor entendimento da interação entre a vancomicina e os muropéptidos, pois os estudos com a unidade MurNAc sugerem que pode existir interações importantes no reconhecimento que ainda não foram estudadas e que podem ajudar na resolução da problemática da resistência bacteriana aos antibióticos glicopeptídeos.

3 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foi possível sintetizar com sucesso a unidade MurNAc protegida e três péptidos e três muropéptidos.

A síntese da unidade MurNAc foi efectuada por uma estratégia de protecção ortogonal por duas vias distintas, uma primeira abordagem que partiu da protecção da funcionalidade amina, existente na glucosamina, pelo grupo acetilo (Ac). Na segunda abordagem utilizou-se como grupo protector do grupo amina, o grupo aliloxycarbonilo (Alloc). Comparando os resultados das duas vias sintéticas utilizadas a abordagem que envolveu a utilização do grupo acetilo conduziu com sucesso à preparação do derivado de MurNAc pretendido. No entanto esta via envolveu 7 passos e um rendimento global de 3%.

Quanto à via sintética envolvendo o grupo aliloxycarbonilo, embora não se tenha finalizado a sequência sintética, esta revelou ser promissora, necessitando de ser optimizada. O intermediário **17** foi obtido com 38% de rendimento global após 4 passos de síntese nesta estratégia.

Para a síntese peptídica foi usada uma estratégia de síntese peptídica em fase sólida (SPFS), que se verificou ser uma técnica útil e bastante eficaz para este tipo de compostos. Os péptidos preparados consistiram numa sequência de cinco resíduos, cuja diferença está no aminoácido terminal da cadeia, tendo sido utilizados os seguintes aminoácidos D-Ala, Gly e D-Ser. Quanto ao resíduo D-Ser este apresenta na sua cadeia lateral um grupo hidroxilo que teve de ser protegido para se proceder à técnica SPFS, tendo-se recorrido à protecção com o grupo TBDMS. Para tal efectuou-se a protecção por duas estratégias, uma com silição directa do grupo hidroxilo do aminoácido Fmoc-D-Ser-OH, e outra via que envolveu a silição do grupo hidroxilo da D-Ser-OH, seguindo-se a inserção do grupo Fmoc. Apesar de se ter conseguido obter o produto pelas duas vias, a síntese em dois passos apresentou rendimento global mais elevado (70%) sendo considerada mais viável.

Em relação à síntese dos péptidos e muropéptidos verificou-se que o processo de purificação necessita de uma optimização futura principalmente após a hidrogenação dos muropéptidos.

As experiências preliminares de RMN que visaram o estudo da interacção da vancomicina com a unidade de MurNAc, sugerem que possam existir interações importantes no reconhecimento que ainda não foram estudadas. Ensaio futuros para exploração da interacção da vancomicina com os muropéptidos preparados, poderão contribuir para o combate à resistência aos antibióticos glicopeptídeos.

4 Procedimento experimental

4.1 Preâmbulo

A componente experimental deste trabalho envolveu o recurso a procedimentos gerais em laboratório descritos de seguida:

- ❖ Os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente. No caso dos solventes utilizados, quando necessário, foram destilados e secos de acordo com os métodos descritos na literatura.⁵⁵
- ❖ A técnica de cromatografia em camada fina (c.c.f.) foi efectuada em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com 0,2mm de espessura em suporte de alumínio. Para a sua revelação recorreu-se a luz ultravioleta (UV) a 254nm, quando necessário utilizou-se a pulverização com revelador indicado em cada situação.
- ❖ A técnica de cromatografia em camada preparativa (c.c.p.) foi efectuada em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com 1mm de espessura em suporte de alumínio. Para a sua revelação recorreu-se a luz ultravioleta (UV) a 254nm, quando necessário utilizou-se a pulverização com revelador indicado em cada situação.
- ❖ A técnica de cromatografia em coluna (c.c.) foi efectuada utilizando sílica Merck Kieselgel 60A, de granulometria 70 – 200 e 40 – 63 “mesh” como fase estacionária.
- ❖ Os espectros foram traçados de forma a obter a transmitância entre 4000 e 400cm⁻¹. Para cada caso os dados foram indicados pela seguinte ordem: estado físico da amostra, frequência máxima de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) e atribuição aos grupos funcionais da molécula quando possível. Os espectros de infravermelho foram traçados num espectrofotómetro PERKIN ELMER, SPECTRUM 1000 FT-IR. As amostras foram analisadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) ou em discos de cloreto de sódio (NaCl). As bandas foram qualificadas como: MF (muito forte), F (forte), Fl (forte larga), M (média), mL (média larga), f (fraca). A atribuição a um grupo funcional na molécula sempre que possível.
- ❖ Os pontos de fusão, não corrigidos, foram medidos no equipamento REICHERT THERMOVAR.
- ❖ Para efectuar a espectroscopia de ressonância magnética num espectrómetro Bruker ARX 400, num Bruker Avance 400 ou num Bruker Avance 600 equipado com 5mm TCI cryprobe. Os espectros de ¹H-RMN foram efectuados a 400 ou 600MHz e os de ¹³C-RMN a 100MHz. Os dados na descrição dos espectros encontram-se pela seguinte ordem: solvente deuterado, desvio químico de cada sinal (δ , em ppm), intensidade relativa do sinal (nH, nº de prótons), multiplicidade do sinal, constante de

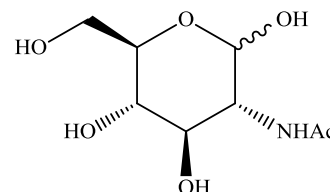
acoplamento (J , em Hertz), atribuição na molécula (sempre que possível), utilizando-se como referência os sinais do solvente.

- ❖ Uma das purificações por HPLC foi efectuada no Laboratório de Análises pertencente à rede REQUIMTE de Química e Tecnologia do departamento de química FCT-UNL. Recorrendo-se a uma coluna Chromolith® RP18e (30°C); Detector PDA para 206 e 270nm (40°C); Soluções tampão: (A) água 0,1% TFA e 50% ACN; (B) 0,1% TFA; Fluxo da fase móvel: 3mL/min; Duração da corrida: 20min. Outra foi efectuada no Laboratório de Superfícies Celulares e Patogénese Bacteriana no Instituto Tecnológico de Química e Bioquímica, num cromatografo Shimadzu (prominence System) equipado com uma coluna Chromolith® 2 x RP8e 4.6 x 100 (30°C); Detector PDA para 206 e 270nm (40°C); Solução tampão: 0,01% TFA; Fluxo da fase móvel: 1mL/min; Duração da corrida: 40min.
- ❖ As rotações ópticas foram medidas no polarímetro PerKinElmer 241MC, recorrendo-se a uma lâmpada de sódio e uma célula de quartzo com um percurso de 1dm.
- ❖ As experiências de RMN para os estudos de interacção foram efectuadas a 298K num espectrómetro BRUKER Avance II+ 600MHz equipado com 5mm TCI cryprobe. Os dados foram analisados recorrendo-se ao programa Topspin 3.2. As amostras foram preparada em DMSO- d_6 com uma concentração de 2mM de cada um dos compostos e quando em mistura na proporção de 1:1,5. Os espectros de protão (sequência de impulsos: zg30) foram adquiridos com 64k pontos complexos, com uma largura de varredura de 12.020Hz (centro a 6.175ppm) e 16 número de scans. Já os espectros de ROESY (sequência de pulsos: roesyphpp.2) foram adquiridos com uma largura de varredura de 9328Hz (centro em 6.175ppm), com 2048 pontos complexos em T2 e 256 pontos complexos em T1, 8 scans por incremento T1 e 32 exames fictícios. Um pulso de 10ms foi usado para ROESY bloqueio de rotação com um pulso guarnição total de 2,5ms e um atraso de relaxamento de 2seg.

4.2 Síntese da unidade glicosídica

4.2.1 Síntese da 2-acetamido-2-deoxi-D-glucose (12)

Preparou-se uma solução fresca de metóxido de sódio (0,29mg de sódio em 20mL de MeOH seco) sob atmosfera inerte. Esta foi adicionada a uma suspensão de hidrocloreto-2-amino-deoxi-D-glucose (**13**) (2,17g; 10,1mmol) em MeOH seco (7mL), com agitação à temperatura ambiente sob atmosfera inerte durante 30min. Adicionou-se anidrido acético (1,5mL; 26,45mmol) à suspensão, ficando com uma aparência de suspensão branca.



Após 19h de reacção a mistura foi colocada sobre gelo a precipitar por 3h. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico frio. Obtendo-se um sólido branco que foi recolhido e seco (2,16g; 97%).

P.f.: 200-205°C.

IV (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3460 (F, OH), 1626 (F, C=O amida), 1550 (F, HNC=O).

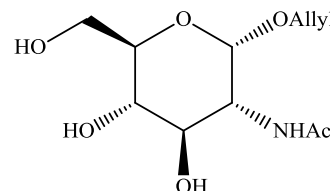
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : anómero α : 7,63 (1H, m, NH), 6,39 (1H, d, $J=3,9$ Hz, OH-1), 4,92 (2H, m, H-1, OH-4), 4,67 (1H, m, OH-3), 4,42 (1H, m, OH-6), 3,56 (5H, m, H-2, H-5, H-3, H-6), 3,10 (1H, m, H-4), 1,82 (3H, s, CH_3); anómero β : 7,76 (1H, m, NH), 6,48 (1H, d, $J=5,6$ Hz, OH-1), 4,92 (2H, m, OH-3, OH-4), 4,53 (1H, m, OH-6), 4,42 (1H, m, H-1), 3,56 (2H, m, H-6), 3,29 (2H, m, H-2, H-4), 3,10 (2H, m, H-3, H-5), 1,82ppm (3H, s, CH_3).

^{13}C -RMN (100,61 MHz, DMSO- d_6) δ : anómero α : 169,33 (CO), 90,56 (C-1), 72,04 (C-4), 70,39 (C-3), 61,13 (C-6), 54,35 (C-2), 22,69 (CH_3); anómero β : 169,33 (CO), 95,55 (C-1), 76,76 (C-5), 74,28 (C-4), 70,82 (C-3), 61,13 (C-6), 57,24 (C-2), 23,05ppm (CH_3).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁴⁴

4.2.2 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (14)

Colocou-se a refluxo uma mistura de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucose (**12**) (3g; 13,6mmol), álcool alílico (30mL seco sobre peneiros moleculares) e $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0,5mL; 4,0mmol) durante 2h em atmosfera inerte.



Posteriormente adicionou-se uma solução de álcool alílico (6mL em 5% de HCl concentrado). A mistura reaccional foi mantida em refluxo por 16h sob atmosfera inerte.

A mistura reaccional obtida foi concentrada por evaporação a pressão reduzida e o resíduo resultante foi recristalizado, obtendo-se no final um sólido branco (0,82g; 46%).

IV (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3476 (F, OH), 1639 e 1619 (F, C=C), 1537 (F, HNC=O).

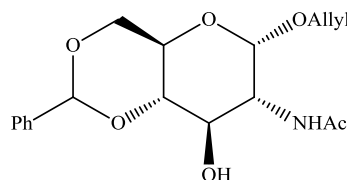
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,84 (1H, d, $J=7,2$ Hz, NH), 5,87 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,29 (1H, dd, $J=17,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,13 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,69 (1H, d, $J=2,8$ Hz, $H-1$), 4,08 (1H, dd, $J=14,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,89 (1H, dd, $J=5,2$ e $13,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,61 (2H, m, $H-2$, $H-6$), 3,47 (3H, m, $H-6$, $H-3$, $H-5$), 3,16 (1H, m, $H-4$), 1,83ppm (3H, s, NCOCH_3).

^{13}C -RMN (100,61 MHz, DMSO- d_6) δ : 169,53 (C-12), 134,70 (C-17), 116,45 (C-18), 95,92 (C-4), 72,94 (C-6), 70,75 (C-2), 70,39 (C-2), 70,39 (C-1), 66,86 (C-16), 60,80 (C-7), 53,93 (C-3) e 22,61ppm (C-13).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁴⁵

4.2.3 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosose (11)

Preparou-se uma mistura de alil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (**14**) (0,92g; 3,53mmol) em DMF seco (7mL) com *p*-TsOH seco (68,9mg; 0,40mmol) e benzaldeído dimetilacetal (1,5mL; 9,9mmol). A mistura reaccional foi aquecida a 75°C a pressão reduzida durante 5h.



A mistura reaccional foi arrefecida e adicionou-se uma solução saturada de NaHCO_3 (17mL). Verificou-se a formação de um precipitado, este foi filtrado e lavado com éter etílico, obtendo-se um sólido branco (0,55g; 60%).

P.f.: 235-240°C.

IV (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3306 (F, OH), 1651 (F, C=O amida).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,98 (1H, d, $J=8,4$ Hz, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 5,89 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,61 (1H, s, Ph-CH), 5,34 (2H, 2d, $J=17,2$ e 10 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,76 (1H, d, $J=3,2$ Hz, $H-1$), 4,14 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $H-5$), 3,96 (1H, dd, $J=13,6$ e $5,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,96 (1H, dd, $J=13,6$ Hz e $5,60$, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,83 (1H, m, $H-2$), 3,69 (3H, m, $H-4$, $H-5$, $H-6$), 1,85ppm (3H, s, NHCOCH_3)

^{13}C -RMN (100,61 MHz, DMSO- d_6) δ : 169,67 (CO), 137,79 (C-13), 134,49 (C-10), 128,97 (C-14, C-18), 128,11 (C-15, C-17), 126,47 (C-16), 116,94 (C-11), 100,97 (C-12), 96,93 (C-1), 82,10 (C-6), 68,06 (C-5), 67,64 (C-9), 67,31 (C-8), 62,80 (C-7), 54,28 (C-2), 22,61ppm (C-4).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁴⁵

4.2.4 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-*O*-(carboxietil)-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopirranose (15)

Adicionou-se dioxano seco, quente (20 mL) a alil 2-acetamido-2-deoxi-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopirranose (**11**) (0,50 g; 1,44 mmol). Posteriormente adicionou-se NaH (1,32g; 28,6mmol) e aqueceu-se a 95°C durante 2h sob atmosfera inerte.

Reduziu-se a temperatura do banho para 65°C e adicionou-se à mistura reaccional ácido 2-(*S*)-cloro-propiónico (0,56mL; 6,48mmol), mantendo a agitação durante 17h.

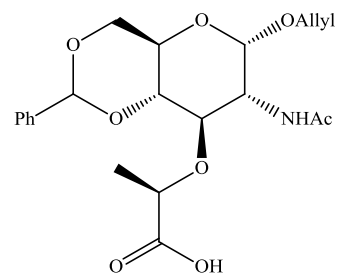
Parou-se o aquecimento, adicionou-se gota a gota H₂O (12,5mL) e extraiu-se com clorofórmio (3 x 10mL). A fase aquosa foi filtrada e acidificada com HCl 1M sob gelo até pH=5. Verificou-se a formação de um precipitado branco que foi seco (2,01g; 36%).

P.f.: 200-203°C

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3433 (F, OH), 1649 (F, C=O amida).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 8,30 (1H, d, J=5,2 Hz, NH), 7,41 (5H, m, Ar-H), 5,88 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 5,61 (1H, s, Ph-CH), 5,32 (1H, d, J=17,1 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,17 (1H, d, J=10,4 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,80 (1H, s, H-1), 4,14 (4H, m, Ha lactato, CH₂CH=CH₂, H-6), 3,95 (1H, dd, J=4,8 e 13,6 Hz, CH₂CH=CH₂), 3,68 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 1,84 (3H, s, NHCOCH₃), 1,48ppm (3H, d, J=6,8 Hz, CH₃ lactato).

¹³C-RMN (100,61 MHz, DMSO-d₆) δ : 175,2 (COOH), 169,4 (NHCOCH₃), 137,6 (C(Ar)-CH), 134,4 (CH₂CH=CH₂), 128,9 (m-C(Ar)), 128,0 (p-C(Ar)), 126,4 (o-(Ar)), 116,8 (CH₂CH=CH₂), 100,9 (Ph-CH), 96,4 (C-1), 81,8 (C-4), 68,0 (CHCH₃ Lac), 67,5 (CH₂CH=CH₂), 66,79 (C-6), 62,8 (C-5), 59,1 (C-2), 23,3 (NHCOCH₃), 22,5ppm (CH₃lactato).



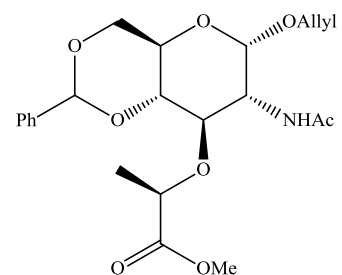
4.2.5 Síntese da alil 2-deoxi-3-*O*-((*R*)-1'-metoxycarboniletil)-4,6-*O*-benzilidene-2-(acetil)- α -D-glucopirranose (10)

Dissolveu-se uma mistura de alil 2-acetamido-2-deoxi-3-*O*-(carboxietil)-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopirranose (**15**) (178mg; 0,42mmol) e CS₂CO₃ (169mg; 1,24mmol) em ACN seco (7,6mL) e destilado, tendo-se adicionado gota a gota iodeto de metilo (30μl; 0,96mmol). Deixou-se a mistura reaccional com agitação à temperatura ambiente em atmosfera inerte, *overnight*.

O crude reaccional foi filtrado sob celite, concentrado e diluído em acetato de etilo. Extraiu-se com H₂O, secou-se a fase orgânica e evaporou-se obtendo-se um sólido amarelo claro (123,9mg; 67%).

P.f.: 197-199°C.

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1732 (F, C=O éster), 1654 (F, C=O amida).



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,54 (1H, m, NH), 7,42 (5H, m, Ar-H), 5,88 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-CH), 5,25 (3H, m, CH₂CH=CH₂, H-1), 4,53 (1H, q, J=13,6 e 6,4 Hz, H_αlactato), 4,26 (1H, m, H-3), 4,14 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 4,00 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 3,76 (8H, m, COOCH₃, H-2, H-4, H-5, H-6), 2,06 (3H, s, NHCOCH₃), 1,42 ppm (3H, d, J=6,8 Hz, CH₃ lactato).

4.2.6 Síntese da 2-aliloxicarbonil-2-deoxi-glucopiranosose (19)

Dissolveu-se hidrocloreto-2-amino-deoxi-D-glucose (**13**) (2,62g; 12,5mmol) em H₂O (43mL) e adicionou-se NaHCO₃ (2,57g; 30,6mmol).

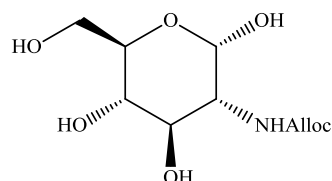
Adicionou-se gota a gota a 0°C AllocCl (1,3mL; 12,2mmol) e deixou-se a agitar por 2h sob atmosfera inerte e temperatura ambiente.

Evaporou-se a baixa temperatura, adicionou-se de seguida MeOH, formando um precipitado. Este foi filtrado e desprezado, concentrou-se a fase orgânica obtendo-se um sólido branco (quant.).

P.f.: 146-154°C.

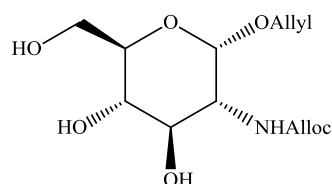
IV (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3374 (l, OH), 1687 (F, C=O carbamato).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 6,65 (1H, d, J=8,0, NH), 6,42 (1H, m, OH), 5,90 (1H, m, COOCH₂CH=CH₂), 5,30 (1H, d, J=17,6 Hz, COOCH₂CH=CH₂), 5,16 (1H, d, J=10,4 Hz, COOCH₂CH=CH₂), 4,94 (2H, m, H-1, OH), 4,72 (1H, m, H-4), 4,44 (3H, m, COOCH₂CH=CH₂, H-6), 3,33 ppm (6H, m, H-2, H-3, H-5, OH).



4.2.7 Síntese da alil2-aliloxicarbonil-2-deoxi-α-D-glucopiranosose (18)

A uma solução de 2-aliloxicarbonil-2-deoxi-glucopiranosose (**19**) (1,46g; 4,81mmol) em 30mL de álcool alílico. Adicionou-se gota a gota TMSCl (0,6mL; 4,72mmol) deixando-se em agitação, sob atmosfera inerte a 60°C durante 4h.



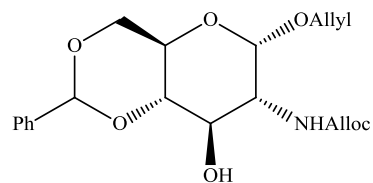
Arrefeceu-se a mistura reaccional e evaporou-se a pressão reduzida, tendo-se obtido uma espuma castanha. A espuma obtida foi usada na síntese seguinte directamente sem purificação (quant.).

IV (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3319 (l, OH), 1694 (F, C=O carbanato).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,89 (2H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 5,52 (1H, d, J=6,8 Hz, OH), 5,24 (4H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 4,87 (1H, m, H-1), 4,56 (2H, m, OH), 4,15 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 3,93 (2H, m, CH₂CH=CH₂), 3,60 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 2,16 ppm (1H, s, OH).

4.2.8 Síntese da alil 2-aliloxycarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (20)

Adicionou-se a uma solução de alil 2-aliloxycarbonil-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (**18**) (1,64g; 4,66mmol) em ACN seco e destilado (11mL), adicionou-se *p*-TSOH (28,4mg; 0,16mmol) e benzaldeído dimetilacetal (1,3mL; 8,73mmol). Deixando com agitação à temperatura ambiente durante 21h.



Adicionou-se uma solução saturada de NaHCO₃ (10mL), formando-se um precipitado castanho. Este foi filtrado e lavado com H₂O (2x10mL) e hexano (2x10mL). Obteve-se um sólido castanho claro (1,22g; 64%).

P.f.: 159-165°C

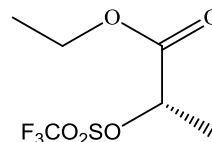
IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3324 (f,OH), 1693 (F, C=O carbamato).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 7,42 (5H, m, Ar-*H*), 5,91 (2H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 5,56 (1H, s, Ph-CH), 5,29 (4H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 5,13 (1H, s, NH), 4,89 (1H, m, *H*-1), 4,60 (2H, d, J=3,6 Hz, COOCH₂CH=CH₂), 4,27 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 4,20 (1H, dd, J= 4,5 e 12,3 Hz, CH₂CH=CH₂), 3,89 (5H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-6b, CH₂CH=CH₂), 3,56 (1H, t, J= 8,0 e 16 Hz, *H*-5), 2,79 ppm (1H, s, OH).

4.2.9 Síntese da alil 2-aliloxycarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxycarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (17)

4.2.9.1 Síntese do éster 2-(*S*)-trifluorometanosulfonil-propanoato de etilo (38)

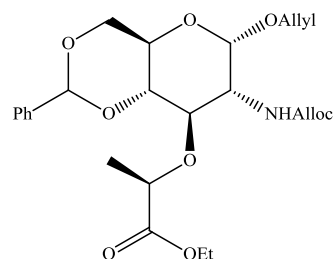
A uma solução de 2-(*S*)-hidroxipropanoato de etilo (0,4mL; 3,53mmol) em DCM seco e destilado (3,4mL), adicionou-se 2,6-lutidina (0,4mL; 3,45mmol). Adicionou-se gota a gota Tf₂O (1,4mL; 8,32mmol) a -78°C. Deixou-se a essa temperatura com agitação durante 30min.



A mistura foi diluída numa mistura de DCM:hexano (1:1; 5mL) e filtrou-se num funil de placa com sílica (1,2g), lavando com DCM:hexano (1:1; 10mL) (óleo amarelo claro, utilizado na síntese seguinte directamente).

4.2.9.2 Síntese da alil 2-aliloxycarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxycarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (17)

A uma solução de alil-2-aliloxycarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- α -D-glucopiranosose (**20**) (1,2g; 2,44mmol) em DCM (38mL) foi adicionado NaH (250mg; 10,4mmol; 60% dispersão em óleo mineral) a temperatura baixa, deixou-se a agitar por 30min.



Adicionou-se o éster 2-(*S*)-trifluorometanosulfonil-propanoato de etilo (**38**) gota a gota, deixou-se a reacção a temperatura ambiente e agitação overnight.

Adicionou-se lentamente gelo ao crude reaccional, dissolveu-se em clorofórmio e extraiu-se com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 10mL). A fase orgânica foi seca, concentrada e purificada por cromatografia em coluna de sílica *flash* por gradiente, usando os eluentes clorofórmio a clorofórmio:acetona (50:20). Obteve-se um sólido branco (199,4mg; 60%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,42 (5H, m, Ar-*H*), 6,61 (1H, d, J=2,0 Hz, *NH*), 5,91 (2H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-*CH*), 5,24 (5H, m, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH=CH₂, *H*-1), 4,60 (2H, m, COOCH₂CH=CH₂), 4,50 (1H, q, J=6,8 e 7,2 Hz, *H*lactato), 4,27 (4H, m, *H*-3, CH₂CH=CH₂, COOCH₂CH₃), 4,01 (1H, m, CH₂CH=CH₂), 3,76 (5H, m, *H*-2, *H*-4, *H*-5, *H*-6), 1,42 (3H, d, J=6,8 Hz, CH₃lactato), 1,28 ppm (3H, t, J=7,2 e 14,4 Hz, COOCH₂CH₃).

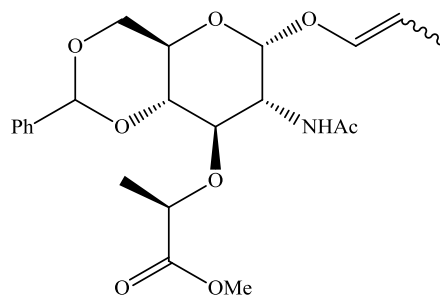
4.2.10 Síntese daprop-1-eno-1-iloxi 2-deoxi-3-*O*-((*R*)-1'-metoxycarboniletil)-4,6-*O*-benzilideno-2-(acetil)-α-D-glucopiranoose (**16**)

Dissolveu-se alil 2-deoxi-3-*O*-((*R*)-1'-metoxycarboniletil)-4,6-*O*-benzilideno-2-(acetil)-α-D-glucopiranoose(**10**) (68mg; 0,16mmol) em tolueno (3,8mL). Adicionou-se Ru(PPh₃)₃Cl₂ a 97% (23,9mg; 0,02mmol) e DIPEA (0,06mmL; 0,34mmol).

Colocou-se a mistura em refluxo, atmosfera inerte durante 4h. Para confirmação da reacção fez-se um espectro de ¹H-RMN usando CDCl₃ como solvente.

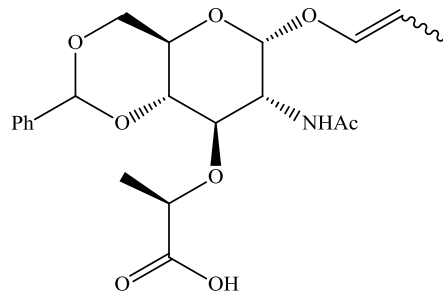
Arrefeceu-se a mistura reaccional e filtrou-se sobre celite lavando com clorofórmio. Evaporou-se o solvente e o crude obtido foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel tendo como eluente acetato de etilo:hexano (1:1). Obteve-se um sólido branco (39,9mg; 59%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,62 (1H, m, *NH*), 7,41 (5H, m, Ar-*H*), 6,07 (1H, 2d, J=12,4 e 6,0 Hz, CH=CHCH₃), 5,59 (1H, d, *H*-1), 5,50 (1Hs, Ph-*CH*), 4,56 (2H, m, *H*α lactato, CH=CHCH₃), 4,25 (1H, m, *H*-2), 3,82 (8H, m, *H*-5, *H*-4, *H*-3, *H*-6, COOCH₃), 2,05 (3H, s, NHCOCH₃), 1,58 (3H, 2d, J=6,8 Hz, CH=CHCH₃), 1,43ppm (3H, m, CH₃ lactato).



4.2.11 Síntese daprop-1-ene-1-iloxi 2-deoxi-3-*O*-((*R*)-1'-carboxietil)-4,6-*O*-benzilidene-2-(acetil)- α -D-glucopiranoose (8)

Dissolveu-se prop-1-eno-1-iloxi 2-deoxi-3-*O*-((*R*)-1'-metoxycarboniletil)-4,6-*O*-benzilideno-2-(acetil)- α -D-glucopiranoose(**16**) (40mg; 0,09mmol) numa mistura de solventes, dioxano:H₂O:THF (2:1:4) (2,8mL). Adicionou-se LiO.H₂O (38,6mg; 0,92mmol). Deixou-se em agitação, temperatura ambiente e atmosfera inerte por 2h.



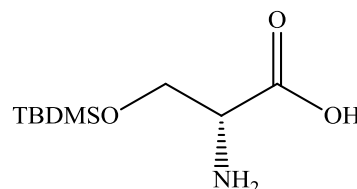
Adicionou-se Dowex 50w 8x400 (200mg) previamente activada e deixou-se em agitação por 15min, filtrou-se e lavou-se com H₂O. O solvente foi evaporado sobre pressão reduzida e o crude obtido foi purificado por coluna Diaion HP-20, tendo-se usado como eluentes H₂O (80mL) e metanol (80mL). Concentrou-se a fase orgânica, tendo-se obtido um sólido branco (26mg; 67%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 7,61 (1H, m, NH), 7,41 (5H, m, Ar-*H*), 6,04 (1H, 2d, *J*=12,8 Hz, CH=CHCH₃), 5,57 (1H, d, *H*-1), 5,20 (1H, s, Ph-CH), 4,18 (2H, m, *H* α lactato, *H*-2, CH=CHCH₃), 3,74 (5H, m, *H*-5, *H*-4, *H*-3, *H*-6), 1,93 (3H, s, NHCOCH₃), 1,50 (3H, 2d, *J*=21,2 e 5,6 Hz, CH=CHCH₃), 1,35 ppm (3H, m, CH₃ lactato).

4.3 Síntese dos péptidos

4.3.1 D-Serina-(OTBDMS)-OH (25)

Dissolveu-se D-Serina-OH (**24**) (500mg; 4,76mmol) em DMF seco (4,8mL). Adicionou-se TBDMSCl (856mg; 5,68mmol) e imidazol (64,90mg; 9,53mmol), deixou-se a mistura reaccional sob atmosfera inerte, agitação e temperatura ambiente *overnight*.



Adicionou-se H₂O:hexano (1:1), deixando em agitação 4h. Ocorreu a formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com hexano, obtendo-se assim o produto sobre a forma de sólido branco (quant.).

P.f.: 175-180°C

$[\alpha]_D^{32^\circ C}$: -38,14 (-0,0389) (c. 1,02; 5 M HCl)

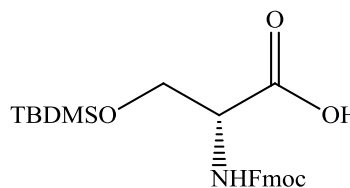
IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3412 (F, NH₂), 3296 (f, OH), 1636 (MF, COO⁻), 1259 (F, Si-CH₃), 1095 (F, Si-O-C), 840 (F, Si(CH₃)₂) e 775 (F, SiC(CH₃)₃).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ : 3,99 (2H, m, CH₂), 3,59 (2H, m, CH), 0,89 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0,09ppm (6H, d, *J*=1,6 Hz, SiC(CH₃)₂).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵²

4.3.2 Fmoc-D-Serina-(OTBDMS)-OH (23)

Dissolveu-se D-Serina-(OTBDMS)-OH (**25**) (741,4mg; 3,38mmol) numa solução de H₂O:Na₂CO₃ a 10% (6,5mL), levou-se a 0°C com agitação. Em paralelo dissolveu-se Fmoc-OSu (1,41g; 38,02mmol) em dioxano (6,5mL), após a dissolução adicionou-se à mistura anterior gota a gota a 0°C tendo deixando-se nestas condições.



Após 1h deixou-se vir à temperatura ambiente e ficou *overnight*.

Adicionou-se H₂O gelada à mistura reaccional, extraiu-se com acetato de etilo e mais solução saturada de Na₂CO₃. As fases aquosas recolhidas foram acidificadas a pH=2 com uma solução HCl 1M e extraiu-se novamente. A fazer orgânica foi seca com Na₂SO₄ e levou-se à secura, obtendo-se um sólido amorfo branco (1,04g; 70%).

P.f.: 71-80°C

[α]_D^{32°C}: - 31,05 (-0,0326) (c. 1,05; MeOH)

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3438 (F, NH), 2929 (F, COOH), 2856 (F, CH), 1717 (F, COO⁻), 1509 (f, NHCO), 1255 (F, Si(CH₃)₃), 1107 (F, SiOCH₂CH₃), 837 (F, Si(CH₃)₂) e 739 (F, SiC(CH₃)₃).

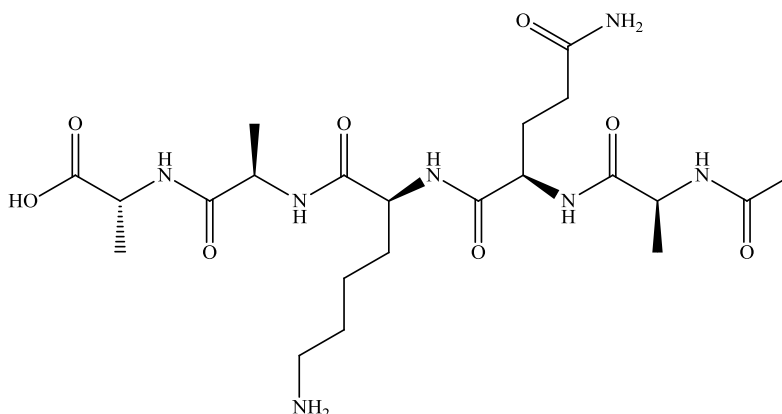
¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ : 7,80 (2H, d, J= 7,6 Hz, *H*-Ar), 7,66 (2H, t, J= 11,6 e 6,4 Hz, *H*-Ar), 7,34 (4H, m, *H*-Ar), (4,44 (4H, m, CH₂), 4,10 (1H, q, J=14,4 e 7,2 Hz, CH) 3,97 (1H, s, *H*_α), 0,89 (9H, s, SiC(CH₃)₃), 0,06ppm (6H, d, J=2 Hz, SiC(CH₃)₂).

4.4 Síntese dos péptidos

4.4.1 Síntese do péptido N-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (26)

Fez-se o *swelling* da resina HMPB-AM (300mg; 0,243mmol) em DMF seca (3h).

Procedeu-se à activação do grupo Fmoc-D-Ala-OH (453,9 mg; 1,46mmol) com DIC (0,228mL; 1,46mmol)



em DMF (3mL) durante 30min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina com DMAP (2,97mg;0,0243mmol) e deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (6mL), retirou-se uma alíquota de resina à qual foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (4 x 1mL; 4 x 5min) e efectuou-se o teste de Kaiser, dando azul.

Colocou-se DMF seca (6mL), adicionou-se DMAP (2,97mg; 0,0243mmol) e anidrido acético (0,14mL; 1,48mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (6mL), foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (4 x 1mL; 4 x 5min) e efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir a síntese da cadeia.

O ciclo de síntese foi repetido para cada aminoácido da cadeia: Fmoc-D-Ala-OH (302,61mg; 0,972mmol), Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (558,22mg; 0,972mmol), Fmoc-D-Gln-OH (358,78mg; 0,972mmol), Fmoc-L-Ala-OH (302,61mg; 0,972mmol) com PyBOP (505,83mg; 0,972mmol), HOBT (131,35mg; 0,972mmol) e DIPEA (0,169mL; 0,972mmol) em DMF seca (2mL).

Após o acoplamento do último aminoácido a resina foi lavada com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 7h, obtendo-se a resina com o péptido com os grupos protectores terminais (508mg).

Fez-se *swelling* de uma parte da resina (196,1mg) em DMF seca (3h; 4mL). Foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser. Adicionou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,50mg; 0,012mmol) e anidrido acético (6,0μl; 0,63mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se o grupo protector Ddiv com uma solução de 2% de hidrazina em DMF (10 x 10min.; 10 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser. Após a remoção do grupo lavou-se com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h.

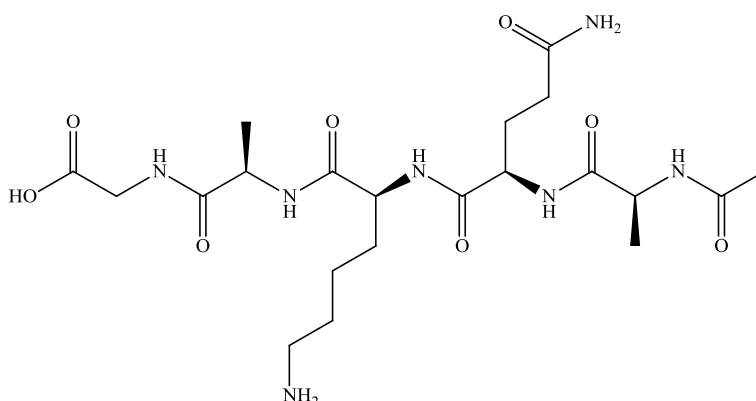
Procedeu-se ao *shrink* em DCM seco (1h, 4mL), o péptido foi desacoplado da resina com uma solução 2% TFA em DCM seco (11 x 1mL). As várias fracções foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em camada preparativa de fase reversa RP18 com eluente MeOH:H₂O 10%, obteve-se o péptido sob a forma de um sólido branco (57mg).

¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O 10 %) δ: 8,64 a 7,87 (5H, m, *NHD*-Ala, *NHD*-Ala, *NHL*-Ala, *NHD*-Gln, *NHL*-Lys), 7,77 a 6,78 (4H, m, *NH₂D*-Gln, *NH₂L*-Lys), 4,39 a 4,18 (5H, m, *Ha* D-Ala, *Ha* D-Ala, *Ha* L-Ala, *Ha* L-Lys, *Ha* D-Gln), 3,00 (2H, m, *Hε* L-Lys), 2,41 a 2,07 (2H, m, *Hγ* D-Gln), 2,03 a 2,02 (5H, m, *CH₃* (Ac), *Hβ* D-Gln), 1,92 a 1,59 (4H, m, *Hβ* L-Lys, *Hδ* L-Lys), 1,51 a 1,31ppm (11H, m, *Hβ* D-Ala, *Hβ* D-Ala, *Hβ* L-Ala, *Hγ* L-Lys).

4.4.2 Síntese do péptido *N*-Ac-L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-Gly (27)

Fez-se o *swelling* da resina HMPB-MBHA (205,7mg; 0,146mmol) em DMF seca (2h., 4mL).

Procedeu-se à activação do grupo Fmoc-Gly-OH (260,04mg; 0,876mmol) com PyBOP (455,87mg; 0,876mmol),



HOBt (118,37mg; 0,876mmol) e DIPEA (152,58μl; 0,876mmol) em DMF (0,5mL) durante 15min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se uma alíquota de resina à qual foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 0,5mL) e efectuou-se o teste de Kaiser, dando azul.

Colocou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,78mg; 0,0146mmol) e anidrido acético (92,48μl; 0,978mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir a síntese da cadeia.

O ciclo de síntese foi repetido para cada aminoácido da cadeia: Fmoc-D-Ala-OH (181,82mg; 0,584mmol), Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (335,39mg; 0,584mmol), Fmoc-D-Gln-OH (215,57mg; 0,584mmol), Fmoc-L-Ala-OH (181,82mg; 0,584mmol) com PyBOP (303,91mg; 0,584mmol), HOBt (78,92mg; 0,584mmol) e DIPEA (101,72μl; 0,584mmol) em DMF seca (0,5mL).

Após o acoplamento do último aminoácido a resina foi lavada com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h, obtendo-se a resina com o péptido com os grupos protectores terminais (305,38mg).

Fez-se *swelling* de uma parte da resina (100mg) em DMF seca (2h; 4mL). Foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10 min.; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser. Adicionou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,78mg; 0,015mmol) e anidrido acético (92,48μl, 0,978mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se o grupo protector Ddiv com uma solução de 2% de hidrazina em DMF (10 x 10min.; 10 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser. Após a remoção do grupo lavou-se com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h.

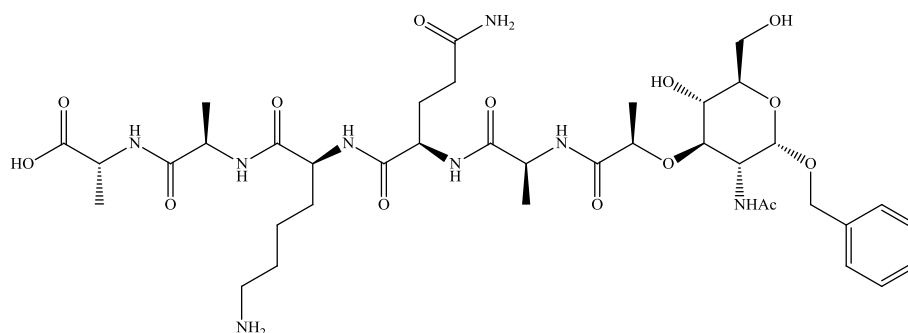
Procedeu-se ao *shrink* em DCM seco (1h; 4mL), o péptido foi desacoplado da resina com uma solução 2% TFA em DCM seco (11 x 1mL). As várias fracções foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em camada preparativa de fase reversa RP18 com eluente MeOH:H₂O 10%, obteve-se o péptido sob a forma de um sólido branco (20,6mg).

¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O 10 %) δ : 8,58 a 8,06 (5H, m, *NHD*-Ala, *NH* Gly, *NHL*-Ala, *NHD*-Gln, *NHL*-Lys), 7,69 a 7,41 (4H, m, *NH*₂D-Gln, *NH*₂L-Lys), 4,43 a 4,17 (5H, m, *Ha* D-Ala, *Ha* Gly, *Ha* L-Ala, *Ha* L-Lys, *H ϵ* L-Lys), 3,88 a 3,83 (1H, m, *Ha*Gly), 2,42 a 2,28 (2H, m, *Ha*D-Gln), 2,04 a 1,99 (5H, m, CH₃ (Ac), *H β* D-Gln), 1,74 a 1,62 (2H, m, *H γ* L-Lys), 1,48 a 1,33 ppm (8H, m, *H β* D-Ala, *H β* L-Ala, *H β* L-Lys).

4.5 Síntese dos muropéptidos

4.5.1 Síntese do muropéptido 32

Fez-se o *swelling* da resina HMPB-MBHA (170,3mg; 0,121mmol) em DMF seca (2h, 4mL).



Procedeu-se à activação do grupo Fmoc-D-Ala-OH (226,0mg; 0,726mmol) com PyBOP (377,8mg; 0,726mmol), HOBt (98,1mg; 0,726mmol) e DIPEA (126,5 μ l; 0,726mmol) em DMF (0,5mL) durante 15min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se uma alíquota de resina à qual foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser, dando azul.

Colocou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,48mg; 0,012mmol) e anidrido acético (76,6 μ l; 0,81mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir a síntese da cadeia.

O ciclo de síntese foi repetido para cada aminoácido da cadeia: Fmoc-D-Ala-OH (150,7mg; 0,484mmol), Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (278,0mg; 0,484mmol), Fmoc-D-Gln-OH (178,7mg; 0,484mmol), Fmoc-L-Ala-OH (150,7mg; 0,484mmol) com PyBOP (251,9mg; 0,484mmol), HOBt (65,4mg; 0,484mmol) e DIPEA (64,3μl; 0,484mmol) em DMF seca (0,5mL).

Após o acoplamento do último aminoácido a resina foi lavada com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h, obtendo-se a resina com o péptido com os grupos protectores terminais (224,98mg).

Fez-se *swelling* de uma parte da resina (113mg) em DMF seca (2h; 4mL). Foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10 min; 5 x 0,5mL) e efectuou-se o teste de Kaiser.

Activou-se ácido 2- (3 -Acetamido-2-benzil-4,6,*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosid-4-iloxi) propanóico (**30**) (342,3mg; 0,726mmol) com PyBOP (377,8mg; 0,726mmol), HOBt (98,1mg; 0,726mmol) e DIPEA (126,5μl; 0,726mmol) em DMF seca (0,7mL). Deixou-se a activar por 15minutos e adicionou-se à resina sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

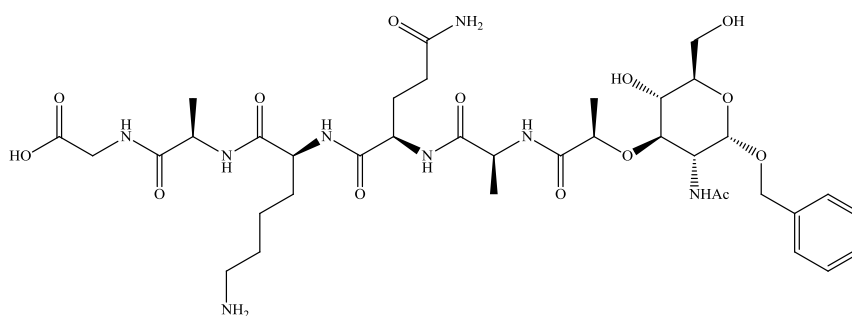
Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), fez-se o teste de Kaiser e retirou-se o grupo protector Ddiv com uma solução de 2% de hidrazina em DMF (10 x 10min; 10 x 1mL) e efectuou-se novamente o teste de Kaiser. Após a remoção do grupo lavou-se com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h.

Procedeu-se ao *shrink* em DCM seco (1h; 4mL), o péptido foi desacoplado da resina com uma solução 2% TFA em DCM seco (11 x 1mL). As várias fracções foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em camada preparativa de fase reversa RP18 com eluente MeOH:H₂O 10%, obteve-se o péptido sob a forma de um sólido branco (8mg).

¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O 10 %) δ : 8,50 a 7,84 (5H, m, *NH*D-Ala, *NH*D-Ala, *NH*L-Ala, *NH*D-Gln, *NH*L-Lys), 7,57 a 7,33 (7H, m, Ar-*H*, *NH*₂L-Lys), 4,88 (1H, d, *J* = 3,2 Hz, H-1), 4,81 a 4,68 sobreposto com o sinal do solvente (2H, Ar-CH₂), 4,38 a 4,17 (5H, m, *H* α D-Ala, *H* α D-Ala, *H* α L-Ala, *H* α L-Lys, *H* α D-Gln), 4,02 a 3,62 (6H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6), 3,01 a 2,91 (2H, m, *H* ϵ L-Lys), 2,17 a 1,91 (4H, m, *H* γ D-Gln, *H* β D-Gln), 1,89 (3H, s, CH₃ (Ac)), 1,84 a 1,60 (3H, m, *H* β L-Lys, *H* δ ' L-Lys), 1,47 a 1,23 ppm (14H, m, *H* β D-Ala, *H* β L-Ala, *H* β D-Ala, *H* β lactato, *H* γ L-Lys, *H* δ '' L-Lys).

4.5.2 Síntese do muropéptido 33

Fez-se o *swelling* da resina HMPB-MBHA (205,7mg; 0,146mmol) em DMF seca (2h.; 4mL).



Procedeu-se à activação do grupo Fmoc-Gly-OH (260,04mg; 0,88 mmol) com PyBOP (455,87mg; 0,88 mmol), HOBt (118,37 mg; 0,88 mmol) e DIPEA (152,58μl; 0,88 mmol) em DMF (0,5mL) durante 15min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se uma alíquota de resina à qual foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 0,5mL) e efectuou-se o teste de Kaiser, dando azul.

Colocou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,78mg; 0,0146mmol) e anidrido acético (92,48μl; 0,98mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir a síntese da cadeia.

O ciclo de síntese foi repetido para cada aminoácido da cadeia: Fmoc-D-Ala-OH (181,82mg; 0,584mmol), Fmoc-L-Lys(Div)-OH (335,39mg; 0,584mmol), Fmoc-D-Gln-OH (215,57mg; 0,584mmol), Fmoc-L-Ala-OH (181,82mg; 0,584mmol) com PyBOP (303,91mg; 0,584mmol), HOBt (78,92mg; 0,584mmol) e DIPEA (101,72μl; 0,584mmol) em DMF seca (0.5mL).

Após o acoplamento do último aminoácido a resina foi lavada com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h, obtendo-se a resina com o péptido com os grupos protectores terminais (305,38mg).

Fez-se *swelling* de uma parte da resina (205mg) em DMF seca (3h; 4mL). Foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20%piperidina em DMF (5x 10 min; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser.

Activou-se ácido 2-(3-Acetamido-2-benzil-4,6,*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosid-4-iloxi) propanóico (**30**) (413,0mg; 0,876mmol) com PyBOP (455,9mg; 0,876mmol), HOBt (118,4mg; 0,876mmol) e DIPEA (152,6μl; 0,876mmol) em DMF seca (0,7mL). Deixou-se a activar por 15min e adicionou-se à resina sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

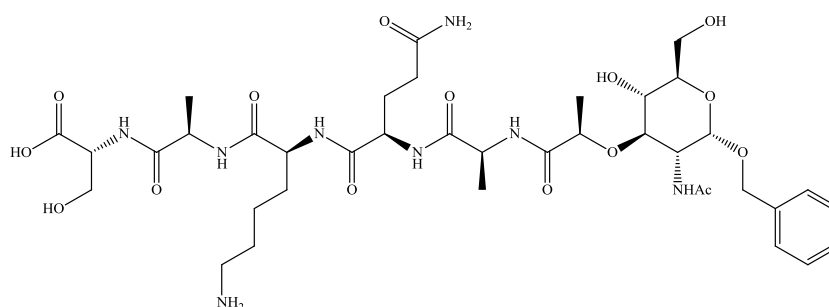
Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), fez-se o teste de Kaiser e retirou-se o grupo protector Ddiv com uma solução de 2% de hidrazina em DMF (10 x 10min; 10 x 1mL) e efectuou-se novamente o teste de Kaiser. Após a remoção do grupo lavou-se com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h.

Procedeu-se ao *shrink* em DCM seco (1h; 4mL), o péptido foi desacoplado da resina com uma solução 2% TFA em DCM seco (11 x 1mL). As várias fracções foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em camada preparativa de fase reversa RP18 com eluente MeOH:H₂O 10%, obteve-se o péptido sob a forma de um sólido branco (26,3mg).

¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O 10 %) δ : 8,50 a 7,85 (6H, m, *NH*D-Ala, *NH*Gly, *NH*L-Ala, *NH*D-Gln, *NH*L-Lys, *NH* (Ac)), 7,52 a 7,32 (7H, m, *Ar-H*, *NH*₂L-Lys), 4,88 (1H, d, *J* = 3,2 Hz, *H*-1), 4,80 a 4,67 sobreposto com o sinal do solvente (2H, *Ar-CH*₂), 4,40 a 4,16 (5H, m, *H* α D-Ala, *H* α L-Ala, *H* α L-Lys, *H* δ L-Lys, *H* α D-Gln), 4,01 a 3,63 (3H, m, *H*-2, *H*-3, *H* α Gly), 3,02 a 2,87 (4H, m, *H* ϵ L-Lys, *H* δ L-Lys), 2,36 a 2,19 (2H, m, *H* γ D-Gln), 2,16 a 1,59 (7H, m, *CH*₃ (Ac), *H* ϵ L-Lys, *H* β D-Dln), 1,47 a 1,19 ppm (11H, m, *H* β D-Ala, *H* β L-Ala, *H* β lactato, *H* γ L-Lys).

4.5.3 Síntese do muropéptido 34

Fez-se o *swelling* da resina HMPB-MBHA (162mg; 0,115 mmol) em DMF seca (2h.; 4mL).



Procedeu-se à activação do grupo Fmoc-D-Ser(OTBDMS)-OH (**23**) (500mg; 1,13mmol) com PyBOP (588,05mg; 1,13mmol), HOBT (152,7mg; 1,13mmol) e DIPEA (196,8 μ l; 1,13mmol) em DMF (0,5mL) durante 15min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), retirou-se uma alíquota de resina à qual foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min.; 5 x 0,5mL) e efectuou-se o teste de Kaiser, dando azul.

Colocou-se DMF seca (3mL), adicionou-se DMAP (1,40mg; 0,012mmol) e anidrido acético (72,79 μ l; 0,77mmol), deixou-se sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL) foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10min; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir a síntese da cadeia.

O ciclo de síntese foi repetido para cada aminoácido da cadeia: Fmoc-D-Ala-OH (143,2mg; 0,460mmol), Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (264,18mg; 0,460mmol), Fmoc-D-Gln-OH (169,8mg; 0,460mmol), Fmoc-L-Ala-OH (143,2mg; 0,460 mmol) com PyBOP (239,3mg; 0,460mmol), HOBt (62,16mg; 0,460mmol) e DIPEA (80,12μl; 0,460mmol) em DMF seca (0,5mL).

Após o acoplamento do último aminoácido a resina foi lavada com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h, obtendo-se a resina com o péptido com os grupos protectores terminais (249,97mg).

Fez-se *swelling* da resina (113mg) em DMF seca (2h; 4mL). Foi removido o grupo Fmoc com uma solução de 20% piperidina em DMF (5x 10 min; 5 x 1mL) e efectuou-se o teste de Kaiser.

Activou-se ácido 2-(3-Acetamido-2-benzil-4,6,*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosid-4-iloxi) propanóico (**30**) (325,34mg; 0,69mmol) com PyBOP (359,08mg; 0,69mmol), HOBt (93,24mg; 0,69mmol) e DIPEA (120,18μl; 0,69mmol) em DMF seca (0,7mL). Deixou-se a activar por 15min e adicionou-se à resina sob agitação, *overnight* à temperatura ambiente.

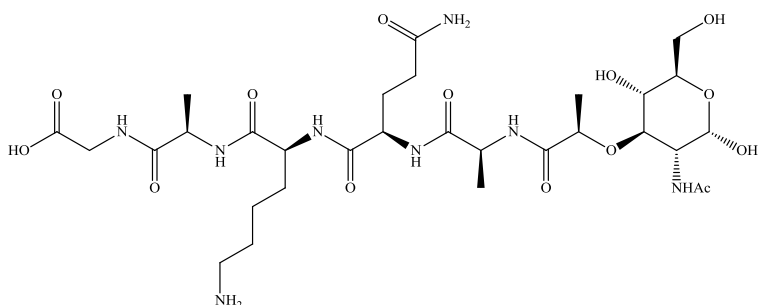
Lavou-se a resina com DMF seca (10 x 1mL), fez-se o teste de Kaiser e retirou-se o grupo protector Ddiv com uma solução de 2% de hidrazina em DMF (10 x 10min; 10 x 1mL) e efectuou-se novamente o teste de Kaiser. De seguida lavou-se com uma solução a 0,1MTBAF em DMF (5 x 1mL; 5 x 5min). Após a remoção dos grupos protectores lavou-se com DMF seca (10 x 1mL), DCM (5 x 1mL) e MeOH (3 x 1mL). Secou-se sob vácuo durante 5h.

Procedeu-se ao *shrink* em DCM seco (1h; 4mL), o péptido foi desacoplado da resina com uma solução 2% TFA em DCM seco (11 x 1mL). As várias fracções foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em camada preparativa de fase reversa RP18 com eluente MeOH:H₂O 10%, obteve-se o péptido sob a forma de um sólido branco (2,7mg).

¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O 10 %) δ : 8,53 a 7,76 (7H, m, *NHD*-Ala, *NHD*-Ser, *NHL*-Ala, *NHD*-Gln, *NHL*-Lys, *NH₂L*-Lys), 7,47 a 7,36 (5H, m, *Ar-H*), 4,95 a 4,57 sobreposto com o sinal do solvente (3H, *Ar-CH₂*, *H-1*), 4,44 a 4,09 (5H, m, *H α* D-Ala, *H α* L-Ala, *H α* L-Lys, *H α* D-Ser, *H α* D-Gln), 3,90 a 3,48 (7H, m, *H ϵ* L-Lys, *H β* D-Ser, *H-2*, *H-3*, *H-4*), 3,03 a 2,93 (3H, m, *H-5*, *H-6*), 2,38 a 2,25 (2H, m, *H γ* D-Gln), 2,1 a 1,50 (9H, m, *CH₃* (Ac), *H β* L-Lys, *H β* D-Dln, *H δ* L-Lys), 1,45 a 1,23 ppm (11H, m, *H β* D-Ala, *H β* L-Ala, *H β* lactato, *H γ* L-Lys).

4.5.4 Síntese do muropéptido 36

Dissolveu-se o muropéptido **33** (26mg; 0,033mmol) em AcOH (5,6mL; 98,8mmol) e adicionou-se $\text{Pd}(\text{OH})_2$ sob carvão (158,1mg; 1,126mmol). Colocou-se o



balão atmosfera de H_2 e deixou-se durante 24h.

Filtou-se a mistura reaccional sob celite e lavou-se com MeOH, obteve-se um sólido branco.

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,68 a 7,04 (7H, m, *NHD*-Ala, *NHL*-Ala, *NHD*-Gln, *NHL*-Lys, *NH*₂L-Lys, *NHGly*), 4,95 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-1), 4,37 a 4,08 (6H, m, *H α* D-Ala, *H α* L-Ala, *H α* L-Lys, *H ϵ* L-Lys, *H α* D-Gln), 2,75 a 2,59 (4H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H α* D-Gln), 2,15 a 1,44 (7H, m, *CH*₃ (Ac), *H β* D-Dln, *H δ* L-Lys), 1,27 a 1,12 ppm (11H, m, *H β* D-Ala, *H β* L-Ala, *H β* lactato, *H γ* L-Lys).

5 Bibliografia

1. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Medical microbiology*: Elsevier Mosby, **2005**.
2. Ausubel, F. M. *Nat. Immunol.* **2005**, 6, 973.
3. Medzhitov, R.; Janeway, C. A. *Science* **2002**, 296, 298.
4. Kahne, D.; Leimkuhler, C.; Wei, L.; Walsh, C. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 425.
5. Kim, C. H.; Park, F. W.; Ha, N. C.; Kang, H. J.; Lee, B. L. *BMB Rep.* **2008**, 41, 93.
6. Williams, D. H.; Bardsley, B. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1999**, 38, 1173.
7. Schafer, M.; Schneider, T. R.; Sheldrick, G. M. *Structure* **1996**, 4, 1509.
8. Yao, N. H.; He, W. Y.; Lam, K. S.; Liu, G. J. *Comb. Chem.* **2005**, 7, 123.
9. Xie, J.; Pierce, J. G.; James, R. C.; Okano, A.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 13946.
10. Reynolds, P. E.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Ch.* **2005**, 49, 21.
11. Kusumoto, S.; Yamamoto, K.; Imoto, M.; Inage, M.; Tsujimoto, M.; Kotani, S.; Shiba, T. *B. Chem. Soc. JPN* **1986**, 59, 1411.
12. Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Heseck, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. *P. Natl. Acad. Sci USA* **2006**, 103, 4404.
13. Zhang, Y.; Fechter, E. J.; Wang, T. S. A.; Barrett, D.; Walker, S.; Kahne, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3080.
14. Inamura, S.; Fukase, K.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7613.
15. Enugala, R.; Carvalho, L. C. R.; Pires, M. J. D.; Marques, M. M. B. *Chem-Asian. J.* **2012**, 7, 2482.
16. Enugala, R.; Carvalho, L. C. R.; Marques, M. M. B. *Synlett* **2010**, 2711.
17. Enugala, R.; Pires, M. J. D.; Marques, M. M. B. *Carbohydr. Res.* **2014**, 384, 112.
18. Carvalho, L. R.; Corvo, M. C.; Enugala, R.; Marques, M. M. B.; Cabrita, E. J. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 323.
19. Debenham, J.; Rodebaugh, R.; Fraser-Reid, B. *Liebigs Ann-Recl* **1997**, 791.
20. Bongat, A. F. G.; Demchenko, A. V. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 374.
21. Chan, W. C.; White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*: OUP Oxford, **2000**.
22. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
23. Merrifield, R. B. *Biochemistry* **1964**, 3, 1385.
24. Atherton, E.; Gait, M. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. *Bioorg. Chem.* **1979**, 8, 351.
25. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447.
26. Joullie, M. M.; Lassen, K. M. *Arkivoc* **2010**, 189.

27. Larsen, B. D.; Christensen, D. H.; Holm, A.; Zillmer, R.; Nielsen, O. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6247.
28. Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shoolery, J. N.; Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955.
29. Look, G. C.; Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7588.
30. Dhalluin, C.; Boutillon, C.; Tartar, A.; Lippens, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10494.
31. Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossing, C.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
32. Roldos, V.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *Chembiochem* **2011**, *12*, 990.
33. Silverstein, R. M. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos: Livros Técnicos e Científicos*, **2000**.
34. Huo, R.; Wehrens, R.; van Duynhoven, J.; Buydens, L. M. C. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *490*, 231.
35. Unione, L.; Galante, S.; Diaz, D.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1280.
36. Molinari, H.; Pastore, A.; Lian, L. Y.; Hawkes, G. E.; Sales, K. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2271.
37. Mackay, J. P.; Gerhard, U.; Beauregard, D. A.; Williams, D. H.; Westwell, M. S.; Searle, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4581.
38. Williams, D. H. *Accounts Chem. Res.* **1984**, *17*, 364.
39. Yang, Z. B.; Vorpapel, E. R.; Laskin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13013.
40. Lee, J.-G.; Sagui, C.; Roland, C. *J. Phys. Chem-US B* **2005**, *109*, 20588.
41. Economou, N. J.; Nahoum, V.; Weeks, S. D.; Grasty, K. C.; Zentner, I. J.; Townsend, T. M.; Bhuiya, M. W.; Cocklin, S.; Loll, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4637.
42. Trevino, J.; Bayon, C.; Arda, A.; Marinelli, F.; Gandolfi, R.; Molinari, F.; Jimenez-Barbero, J.; Hernaiz, M. J. *Chem-Eur.* **2014**, *20*, 7363.
43. Lebreton, F.; Depardieu, F.; Bourdon, N.; Fines-Guyon, M.; Berger, P.; Camiade, S.; Leclercq, R.; Courvalin, P.; Cattoir, V. *Antimicrob. Agents. Ch.* **2011**, *55*, 4606.
44. Berger, I.; Nazarov, A. A.; Hartinger, C. G.; Groessl, M.; Valiahdi, S. M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Chemmedchem* **2007**, *2*, 505.
45. Ghosh, M.; Dulina, R. G.; Kakarla, R.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8387.
46. Hu, Y. J.; Dominique, R.; Das, S.; Roy, R. *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 838.
47. Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; Woelk, E.; Heine, H.; Lindner, B.; Inohara, N.; Kusumoto, S.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232.
48. Jones, D. S.; Gamino, C. A.; Randow, M. E.; Victoria, E. J.; Yu, L.; Coutts, S. M. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 6107.
49. Floyd, C. D.; Lewis, C. N.; Patel, S. R.; Whittaker, M. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37*, 8045.
50. Swaminathan, C. P.; Brown, P. H.; Roychowdhury, A.; Wang, Q.; Guan, R. J.; Silverman, N.; Goldman, W. E.; Boons, G. J.; Mariuzza, R. A. *P Natl. Acad. SCI USA* **2006**, *103*, 684.
51. Fischer, P. M. *Tetrahedron Lett* **1992**, *33*, 7605.

52. Luo, Y.; Evindar, G.; Fishlock, D.; Lajoie, G. A. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42, 3807.
53. Wuthrich, K. *Biopolymers* **1983**, 22, 131.
54. Pearce, C. M.; Williams, D. H. *J. Chem. Soc. PERK T 2* **1995**, 153.
55. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*: Pergamon Press, **1980**.

6 Anexos

6.1 Síntese da unidade MurNAc

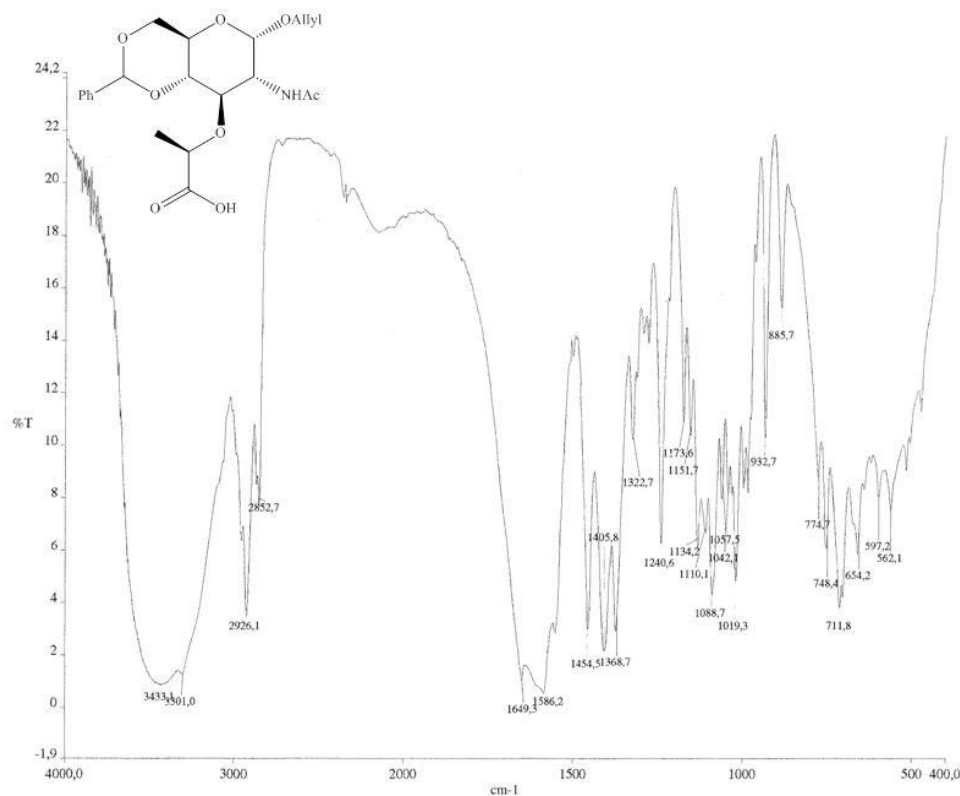


Figura 6.1 Espectro de IV do composto 15 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 400cm⁻¹.

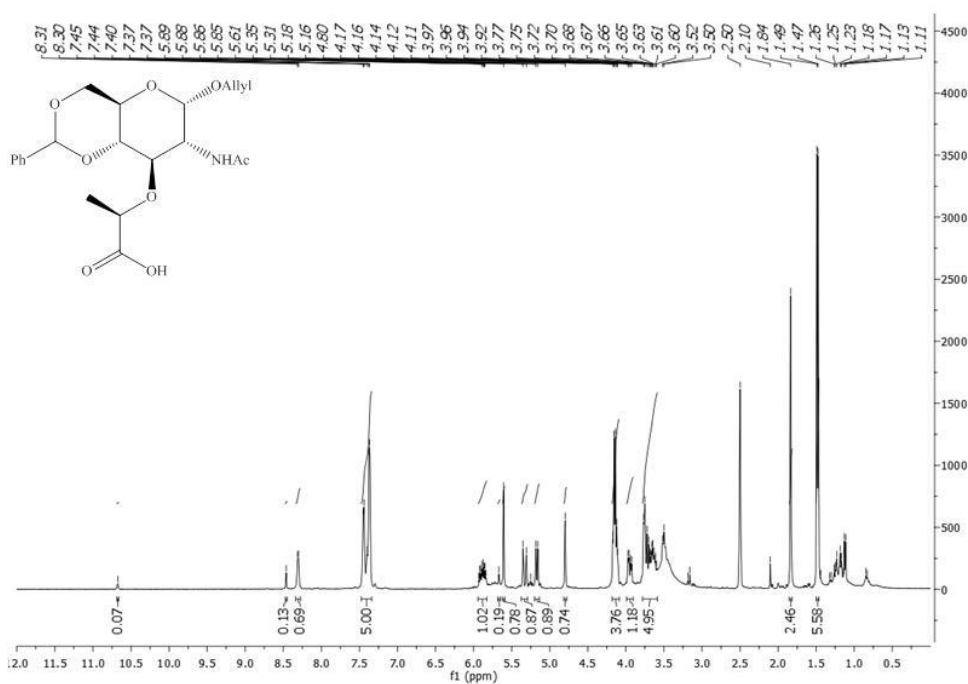


Figura 6.2 Espectro de ¹H-RMN do composto 15 adquirido a 298K, solvente DMSO-d₆ com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

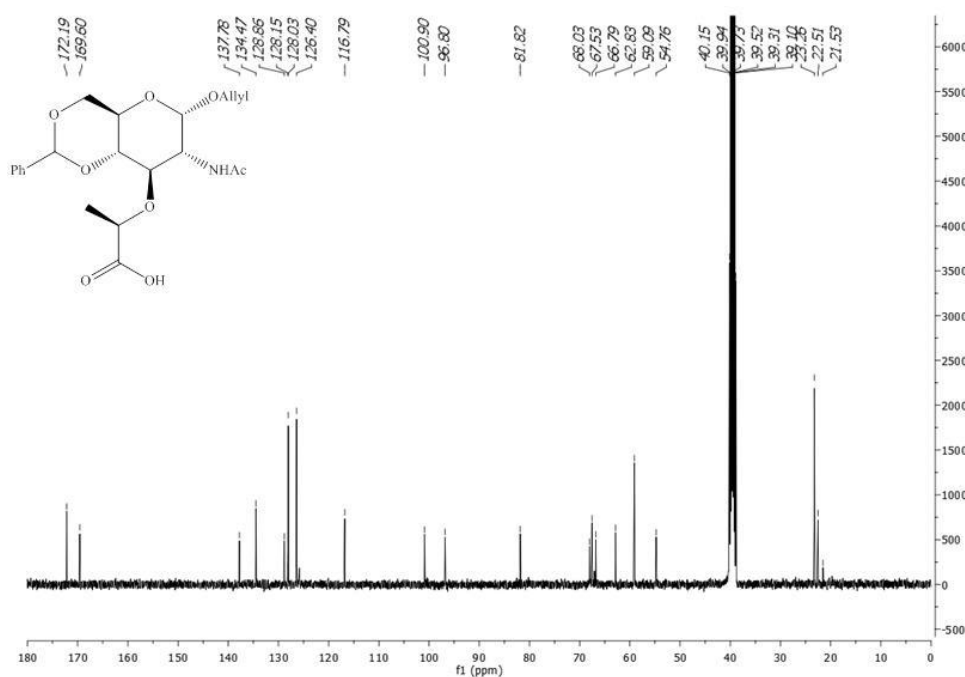


Figura 6.3 Espectro de ^{13}C -RMN do composto 15 adquirido a 298K, solvente DMSO-d_6 com uma janela em F1 de 180 a 0ppm.

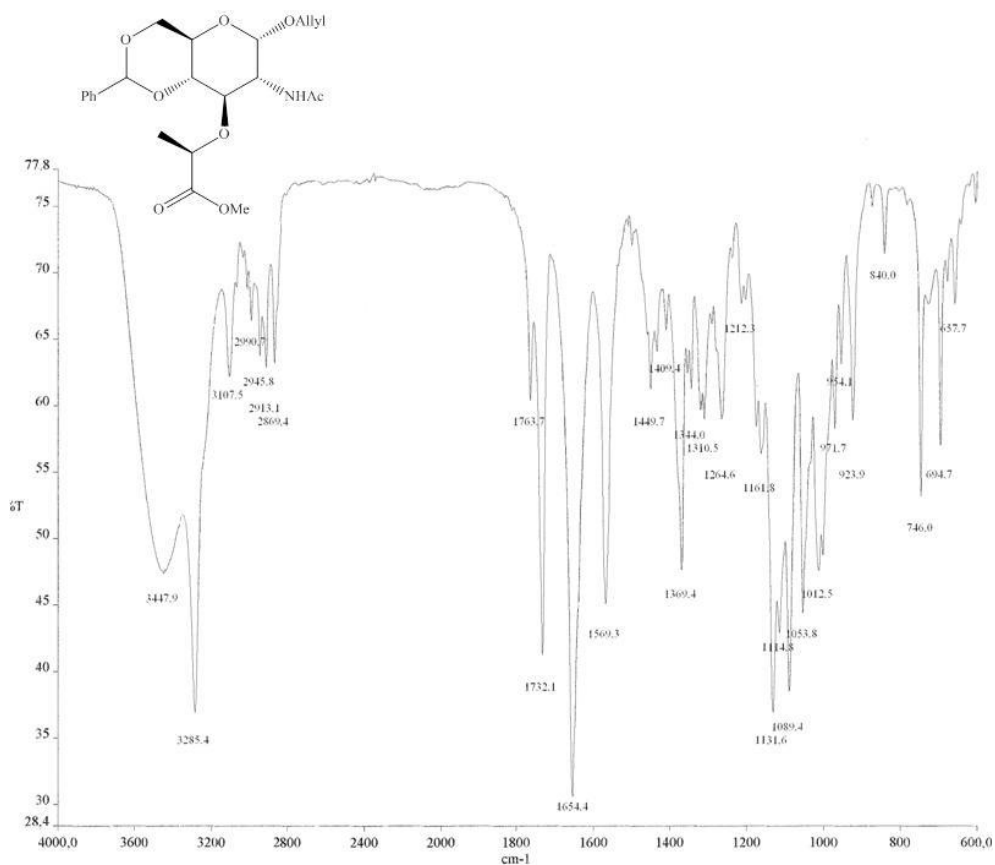


Figura 6.4 Espectro de IV do composto 10 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 600 cm^{-1} .

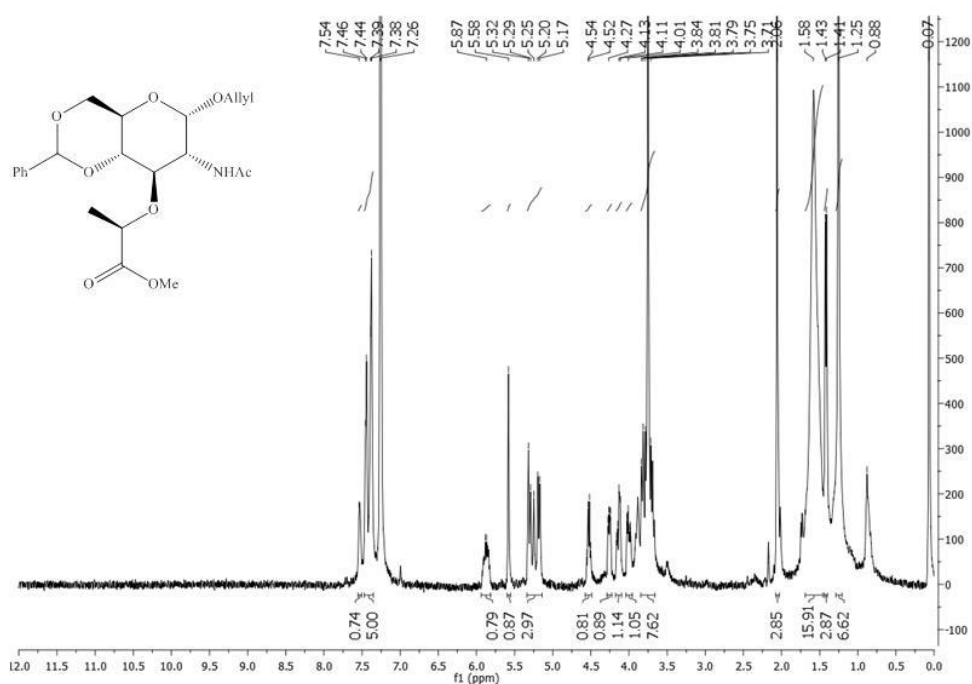


Figura 6.5 Espectro de ^1H -RMN do composto 10 adquirido a 298K, solvente CDCl_3 com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

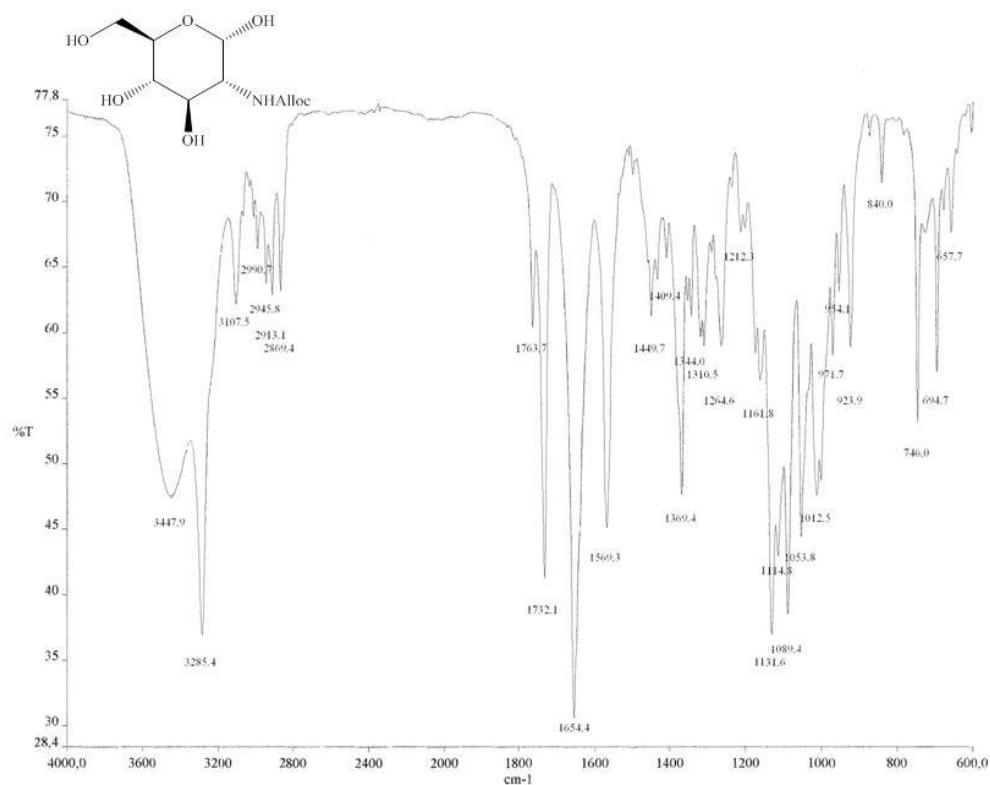


Figura 6.6 Espectro de IV do composto 19 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 600 cm^{-1} .

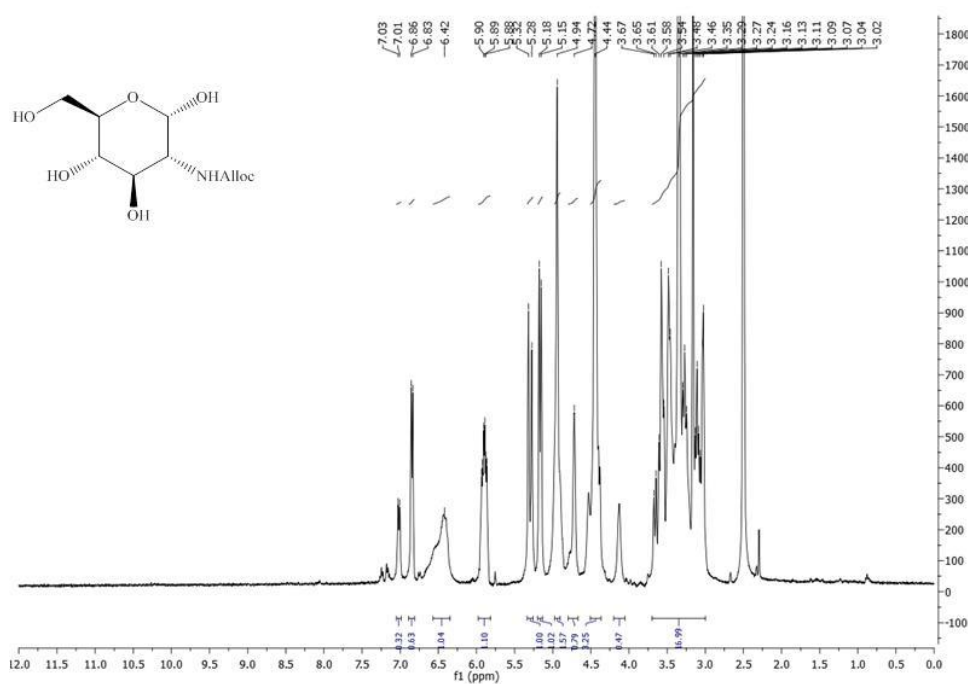


Figura 6.7 Espectro de ^1H -RMN do composto 19 adquirido a 298K, solvente CDCl_3 com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

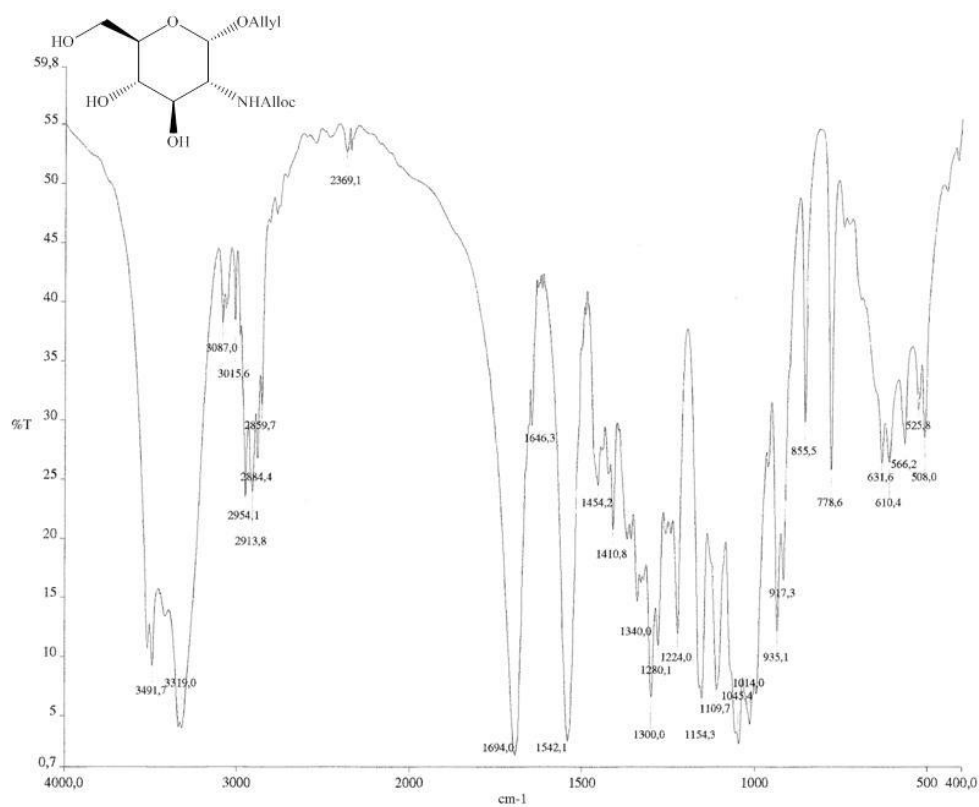


Figura 6.8 Espectro de IV do composto 18 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 400cm⁻¹.

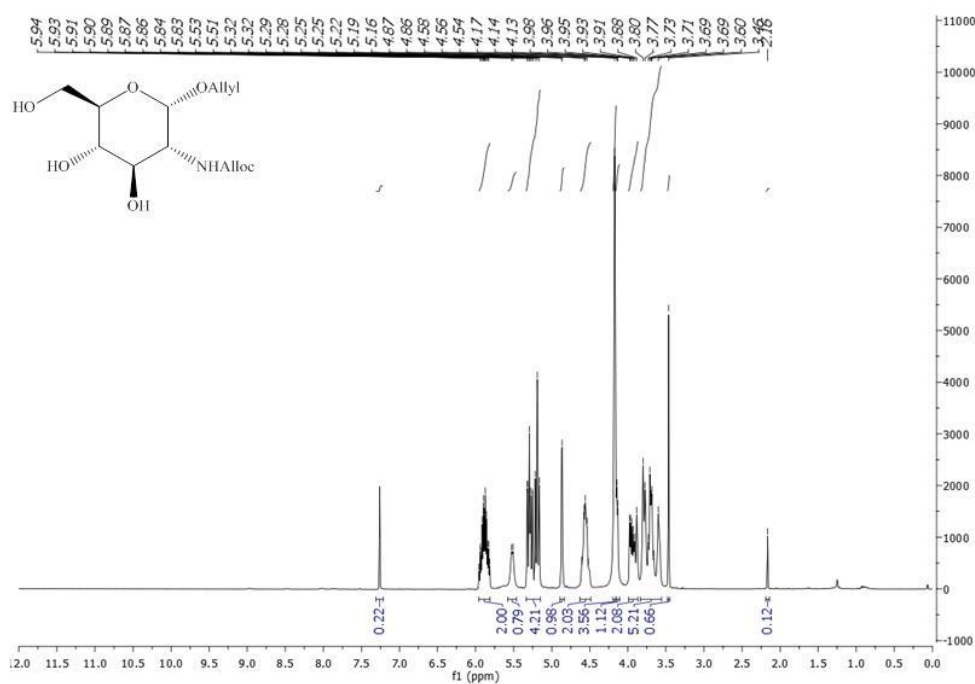


Figura 6.9 Espectro de ^1H -RMN do composto 18 adquirido a 298K, solvente CDCl_3 com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

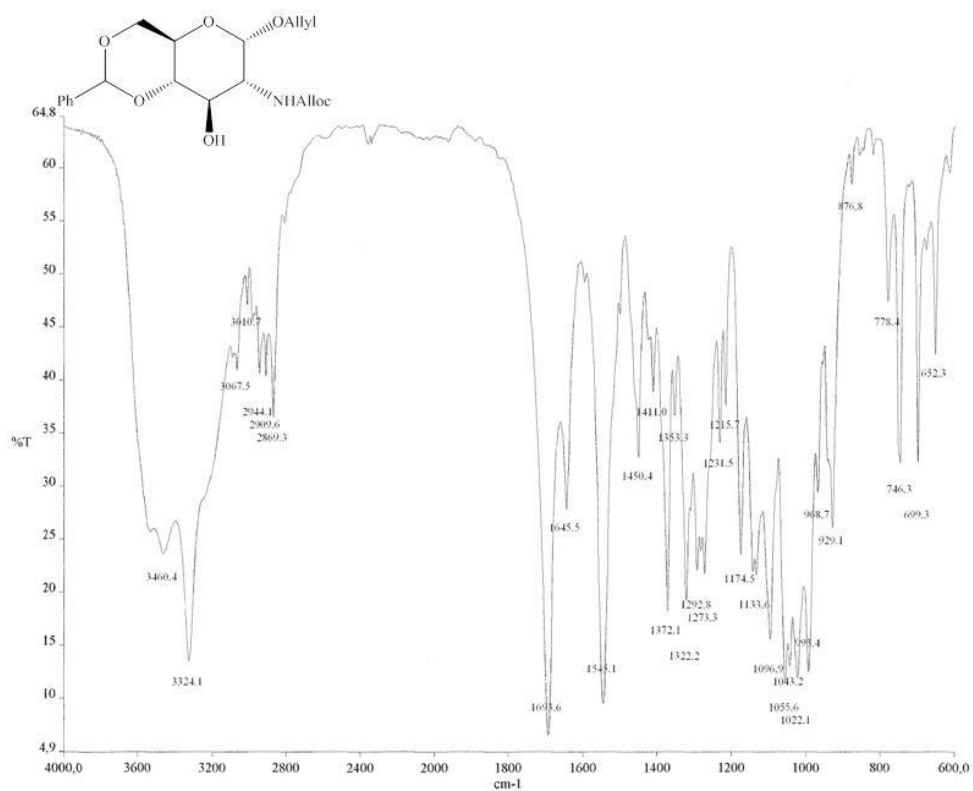


Figura 6.10 Espectro de IV do composto 18 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 600cm⁻¹.

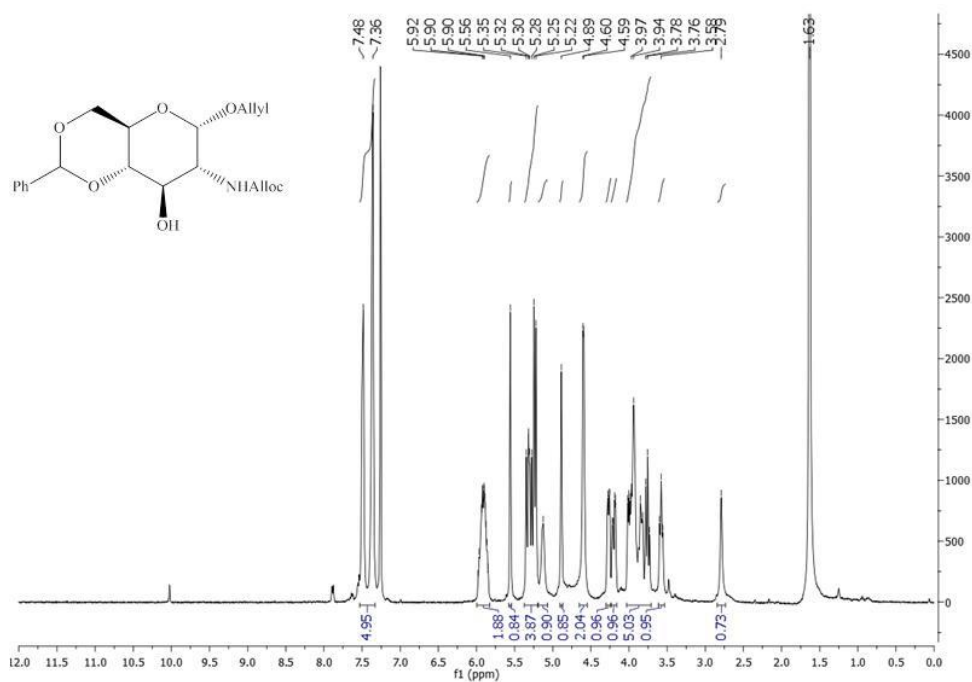


Figura 6.11 Espectro de ^1H -RMN do composto 20 adquirido a 298K, solvente CDCl_3 , com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

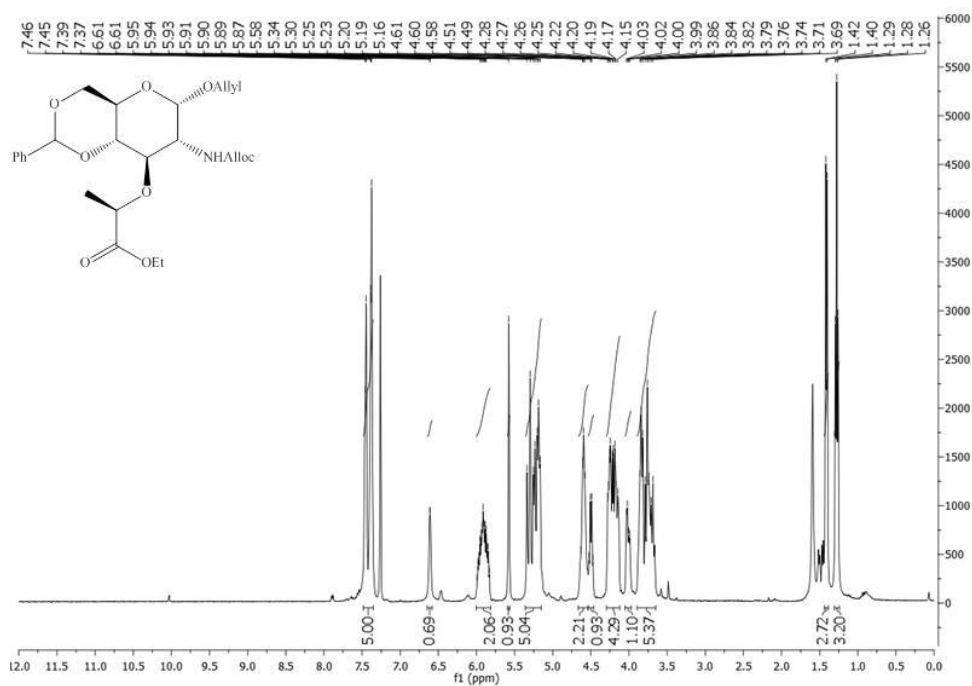


Figura 6.12 Espectro de ^1H -RMN do composto 17 adquirido a 298K, solvente CDCl_3 , com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

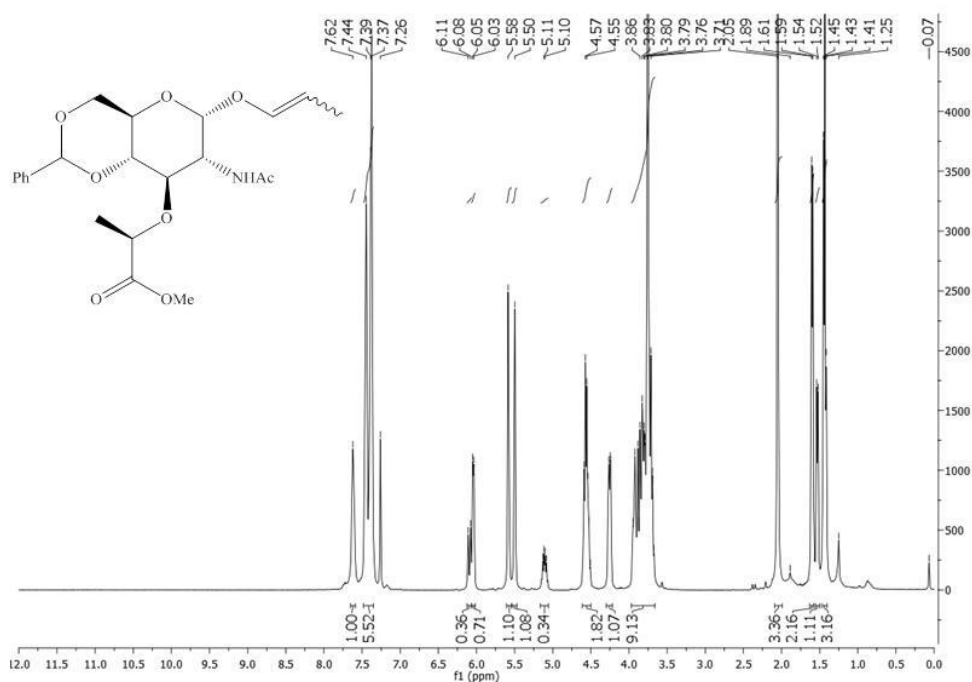


Figura 6.13 Espectro de ¹H-RMN do composto 16 adquirido a 298K, solvente CDCl₃ com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

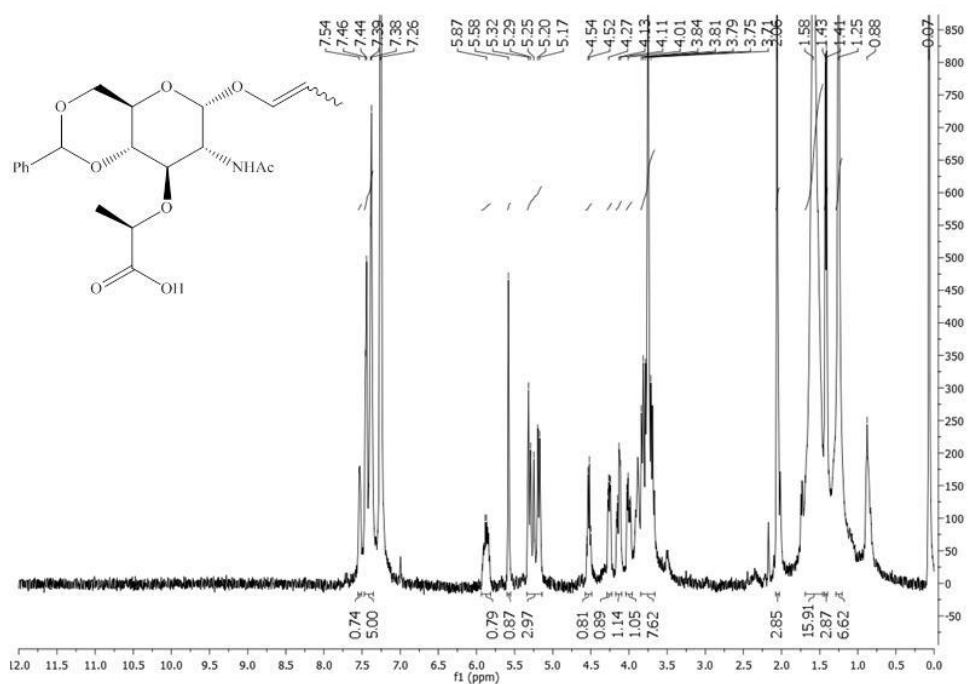


Figura 6.14 Espectro de ¹H-RMN do composto 18 adquirido a 298K, solvente CDCl₃ com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

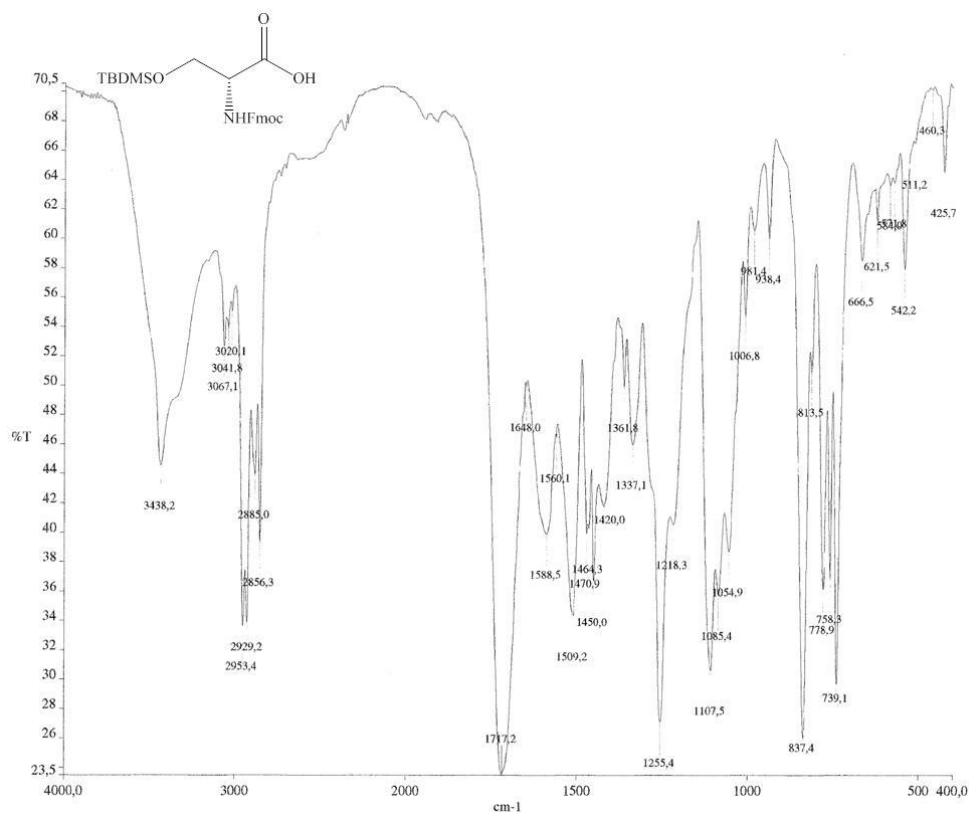


Figura 6.15 Espectro de IV do composto 23 efectuado com pastilha de KBr e com uma janela de 4000 a 400cm⁻¹.

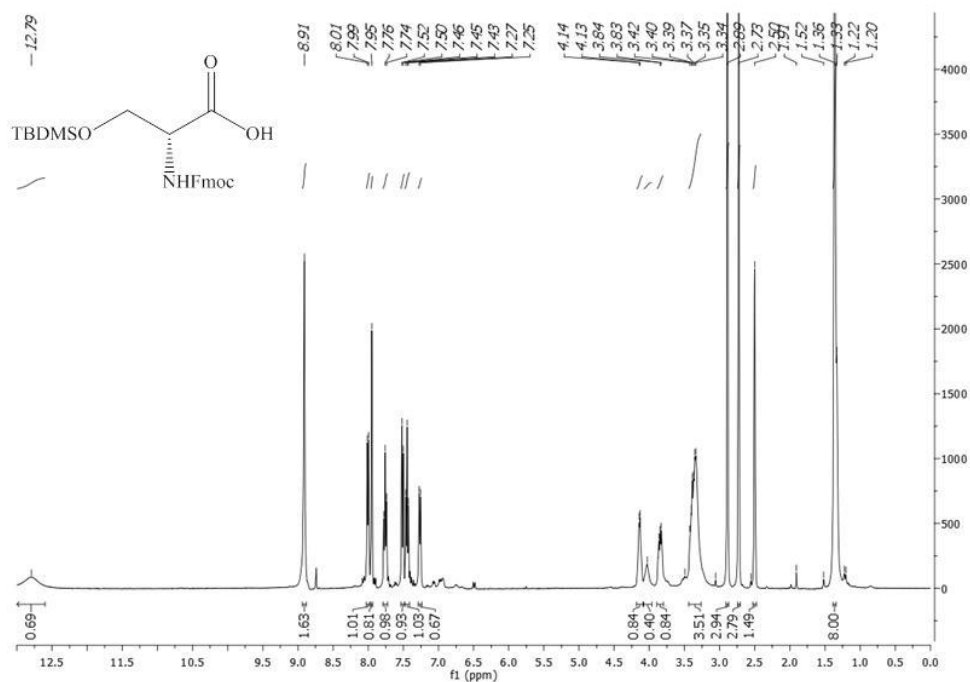


Figura 6.16 Espectro de ¹H-RMN do composto 23 adquirido a 298K, solvente CD₃OD com uma janela em F1 de 13 a 0ppm.

6.2 Síntese dos péptidos e muropéptidos

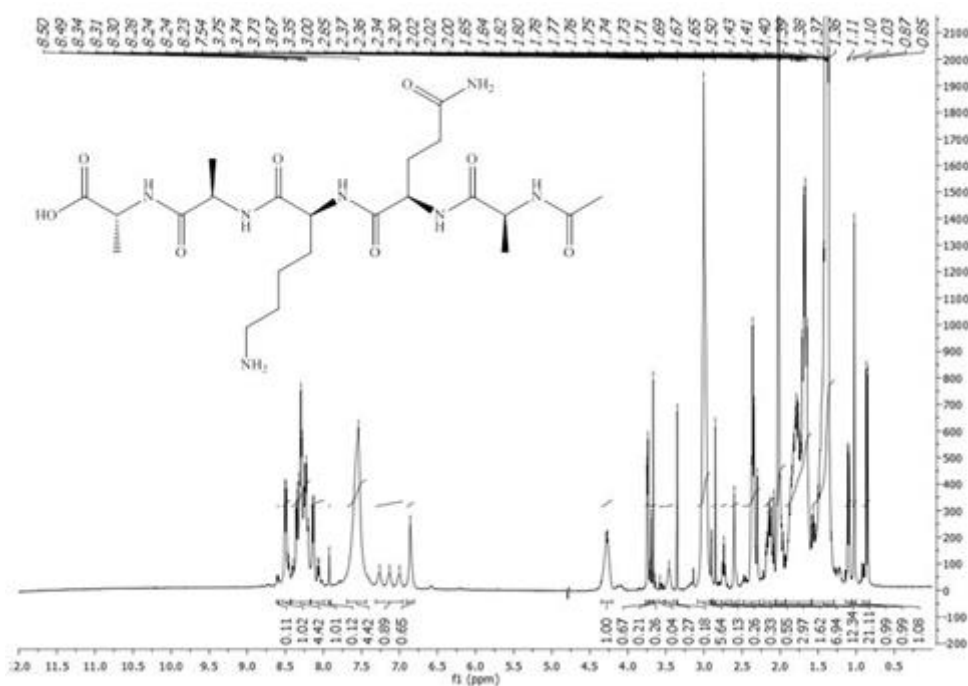


Figura 6.17 Espectro de ^1H -RMN do composto 26 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

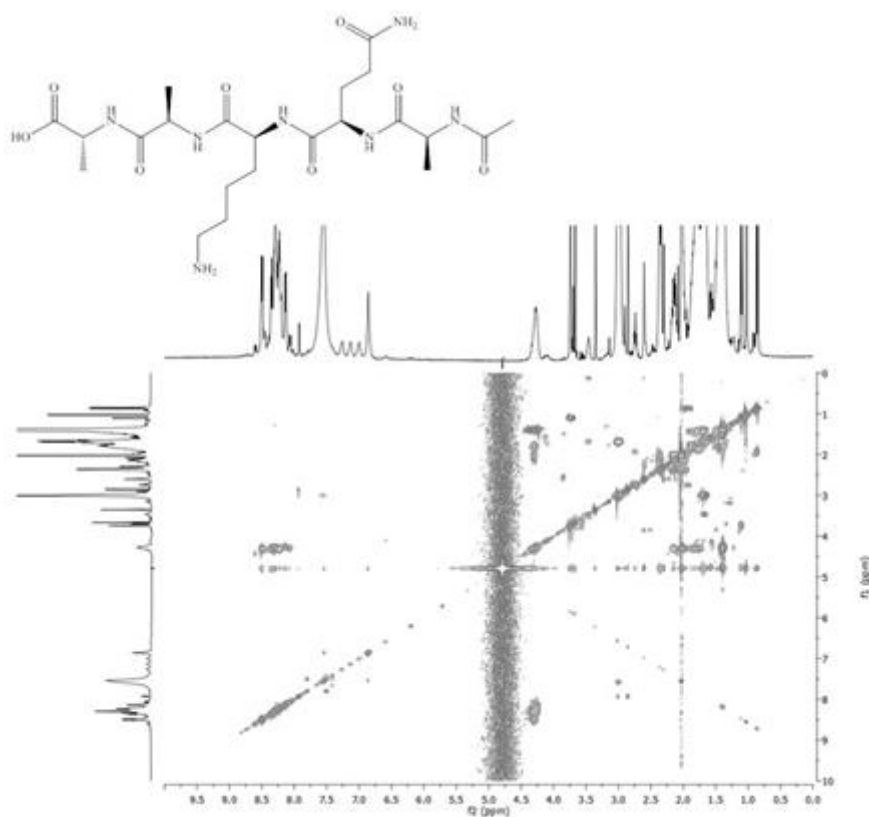


Figura 6.18 Espectro de COSY do composto 26 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

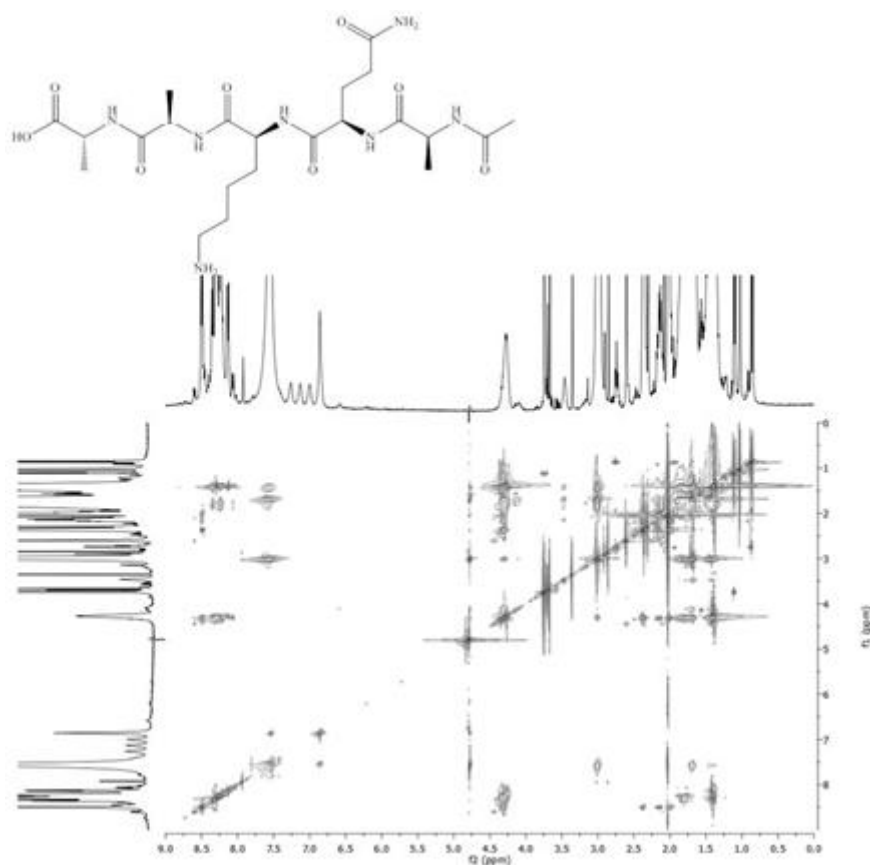


Figura 6.19 Espectro de TOCSY do composto 26 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

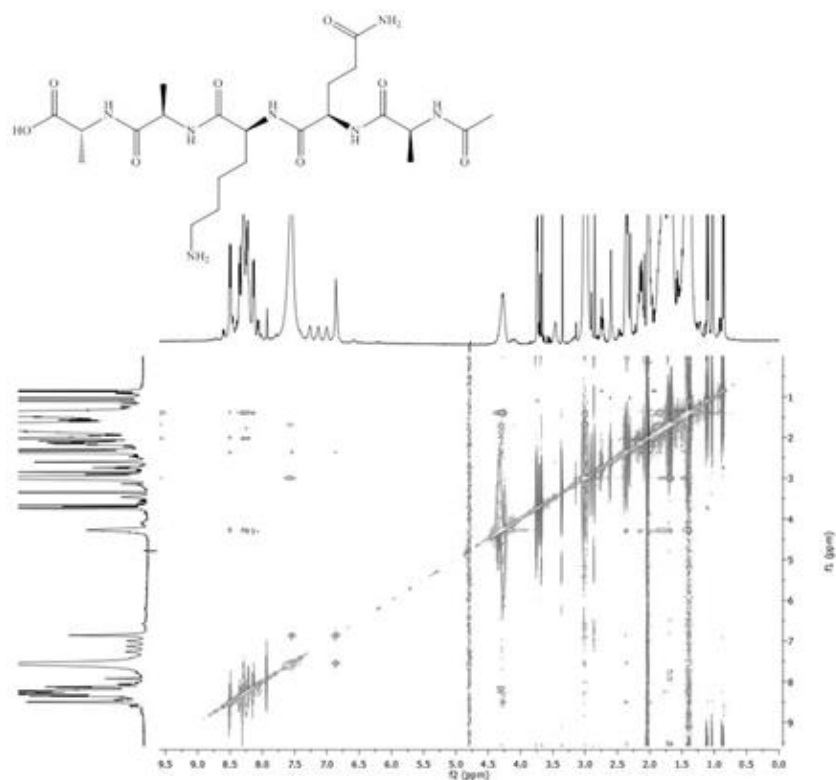


Figura 6.20 Espectro de NOESY do composto 26 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

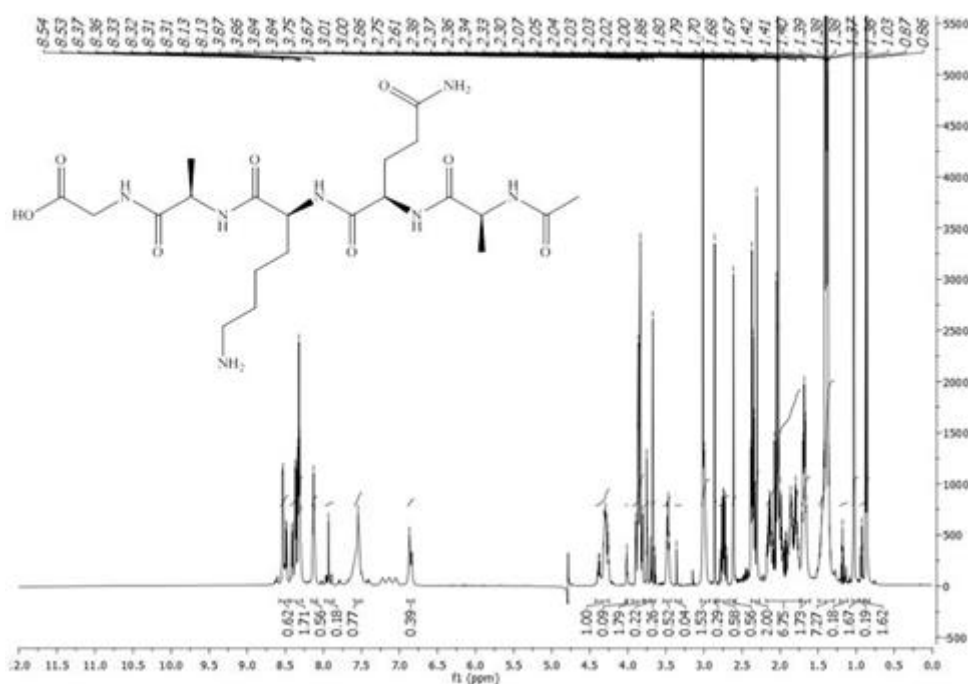


Figura 6.21 Espectro de ^1H -RMN do composto 27 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

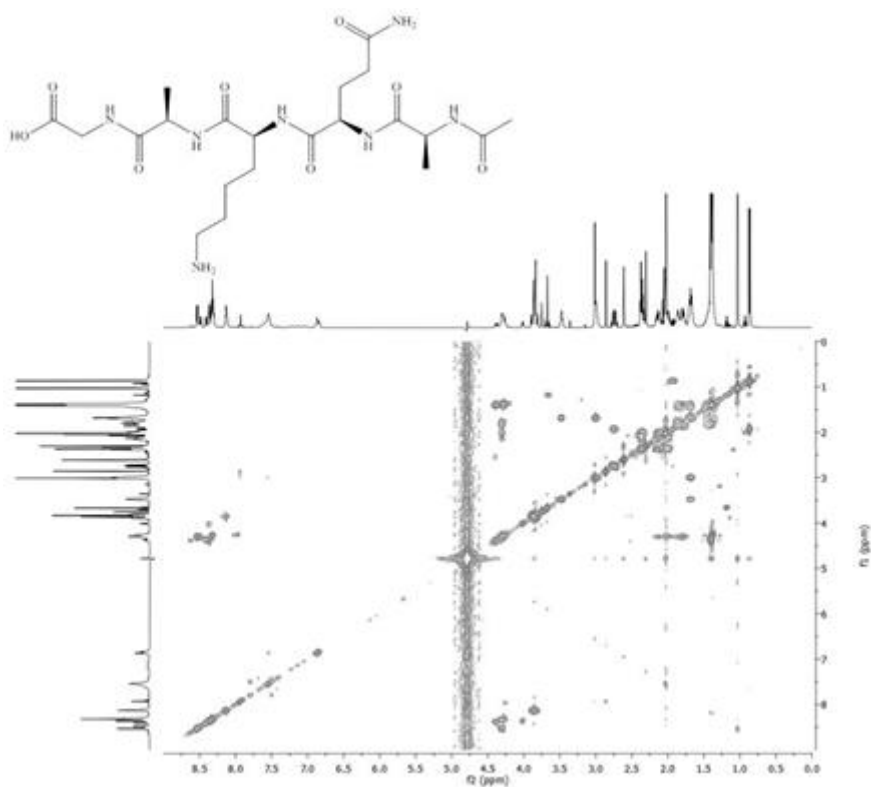


Figura 6.22 Espectro de COSY do composto 27 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O . Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

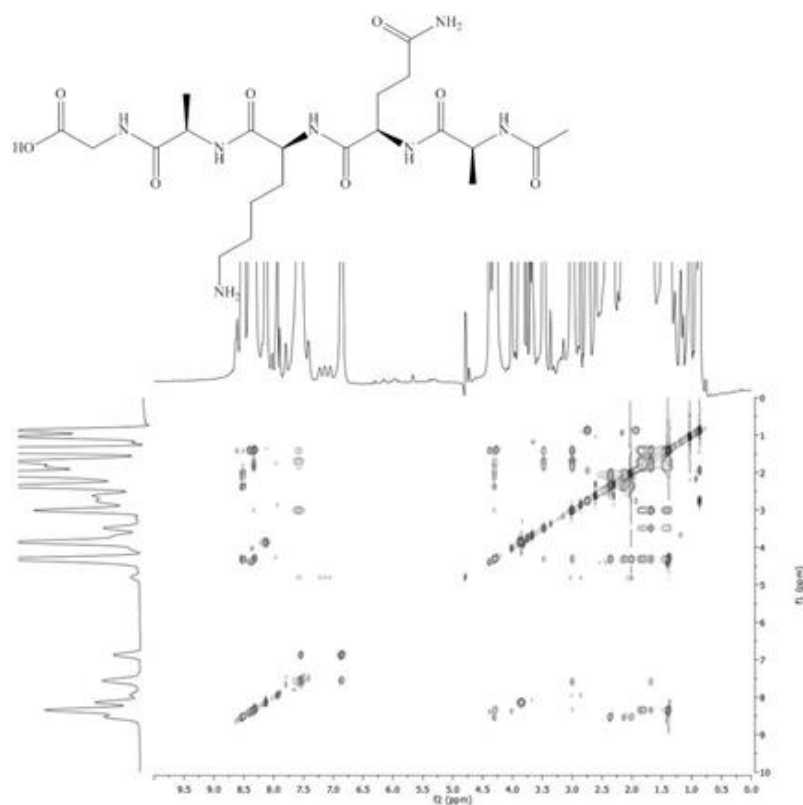


Figura 6.23 Espectro de TOCSY do composto 27 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

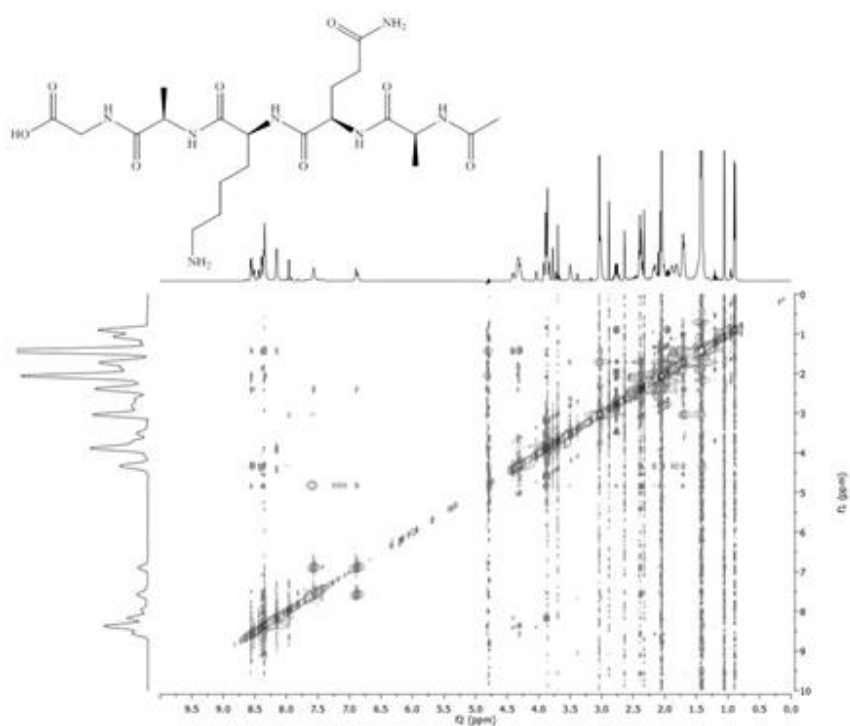


Figura 6.24 Espectro de NOESY do composto 27 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

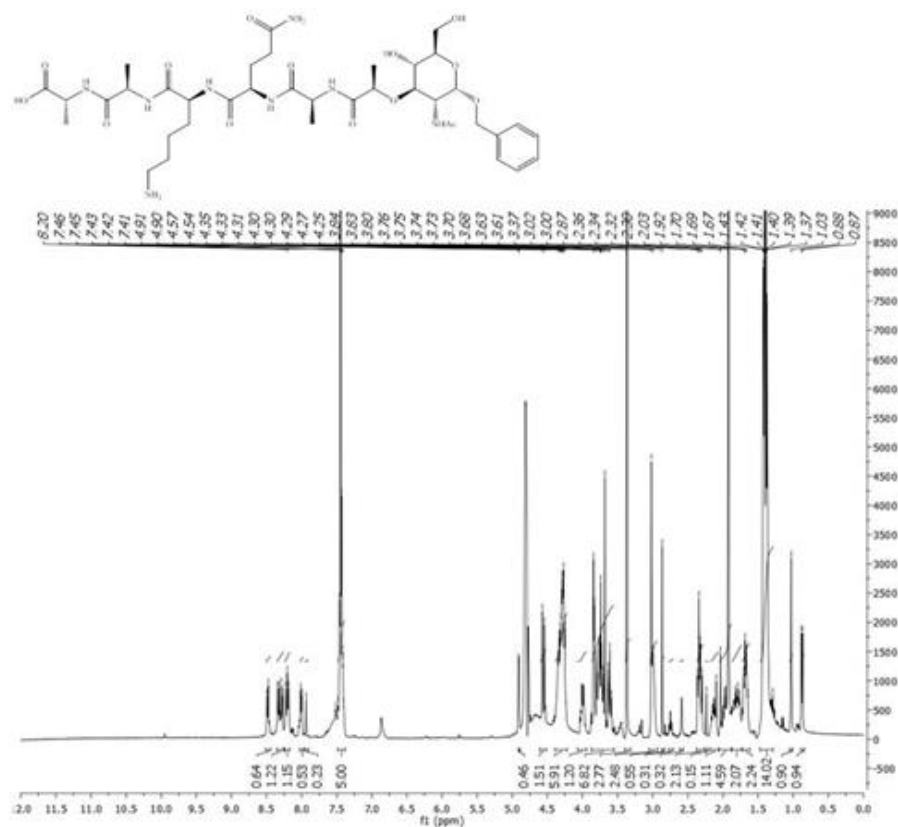


Figura 6.25 Espectro de ^1H -RMN do composto 32 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

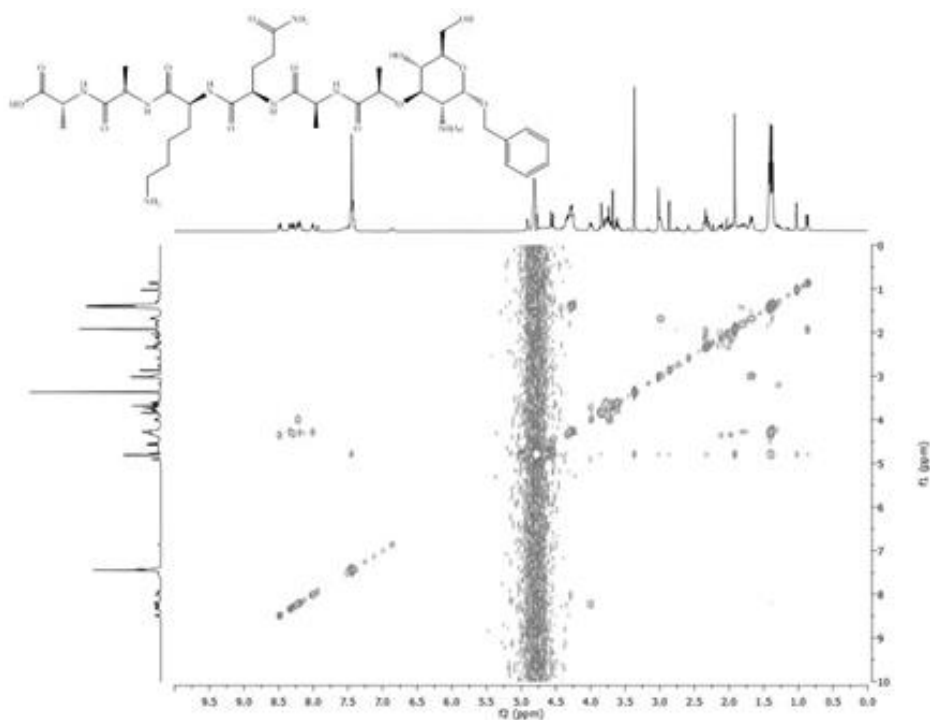


Figura 6.26 Espectro de COSY do composto 32 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O . Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

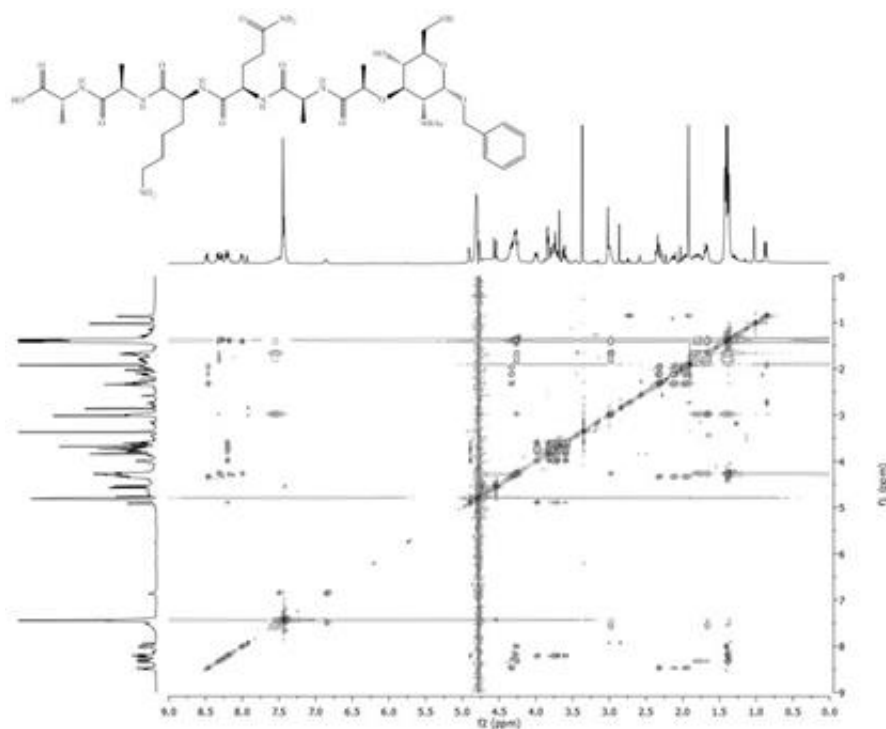


Figura 6.27 Espectro de TOCSY do composto 32 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

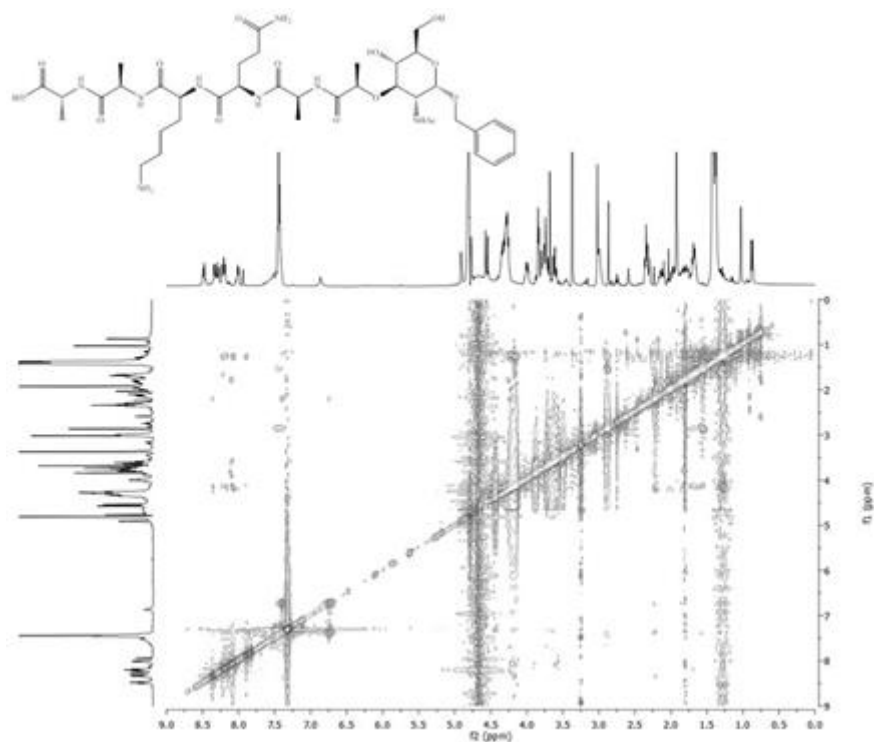


Figura 6.28 Espectro de NOESY do composto 32 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

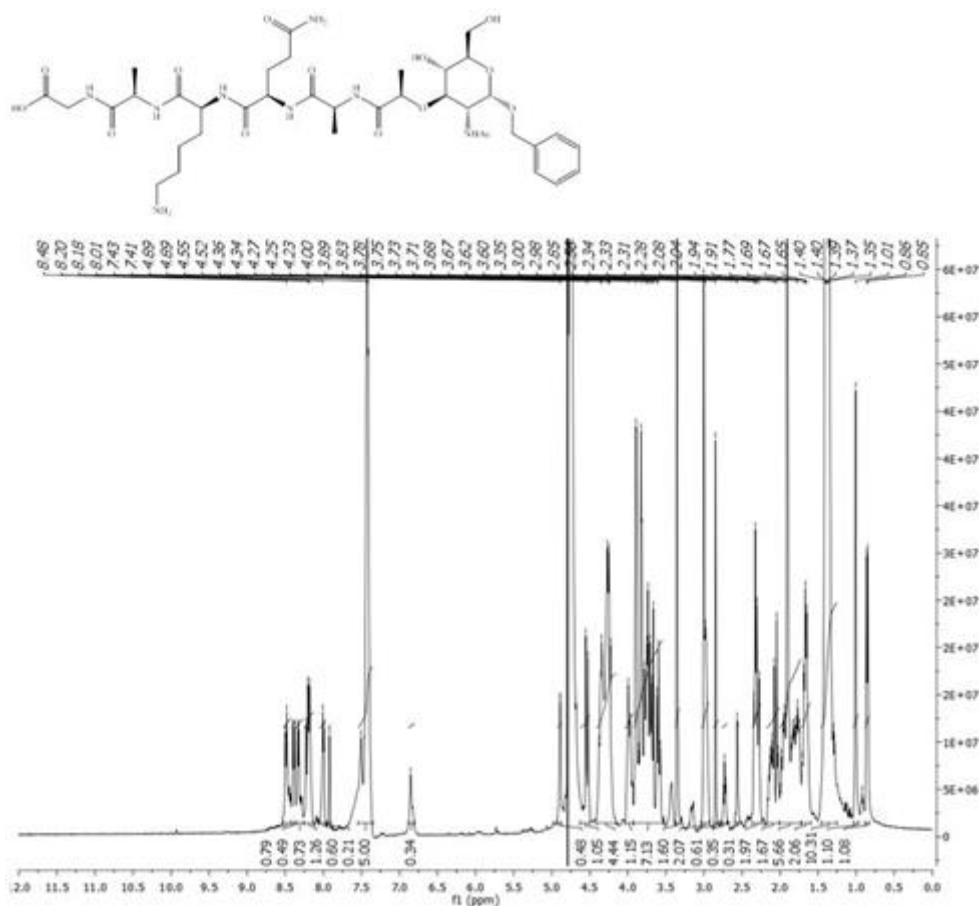


Figura 6.29 Espectro de ^1H -RMN do composto 33 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

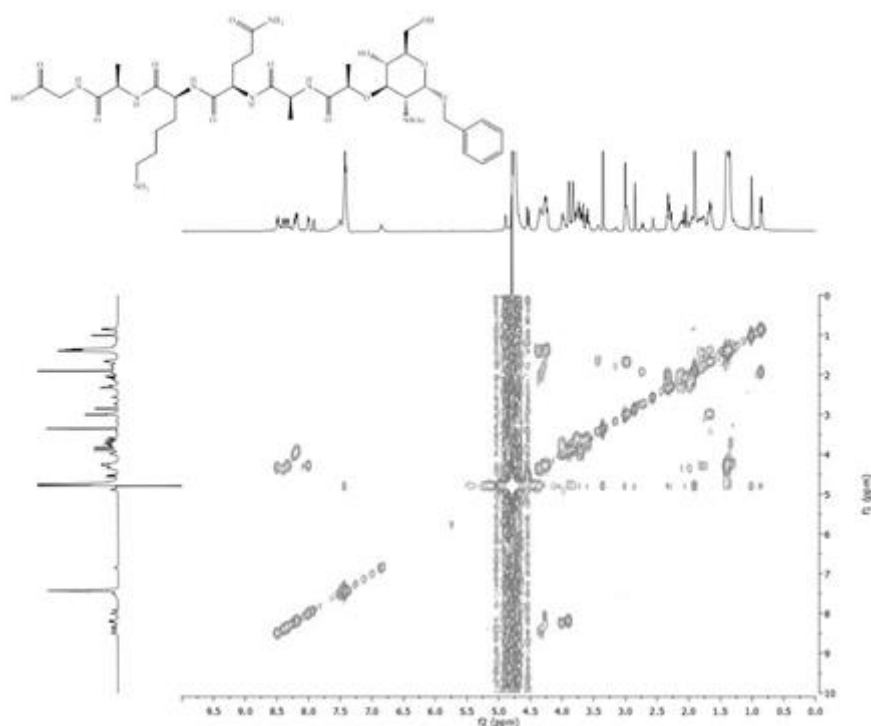


Figura 6.30 Espectro de COSY do composto 33 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

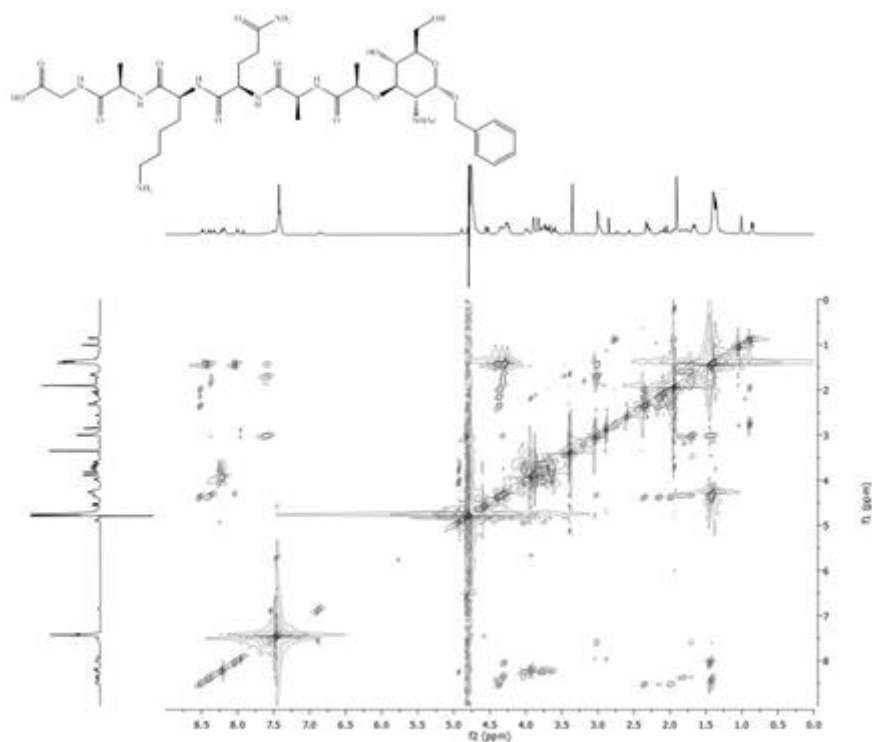


Figura 6.31 Espectro de TOCSY do composto 33 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

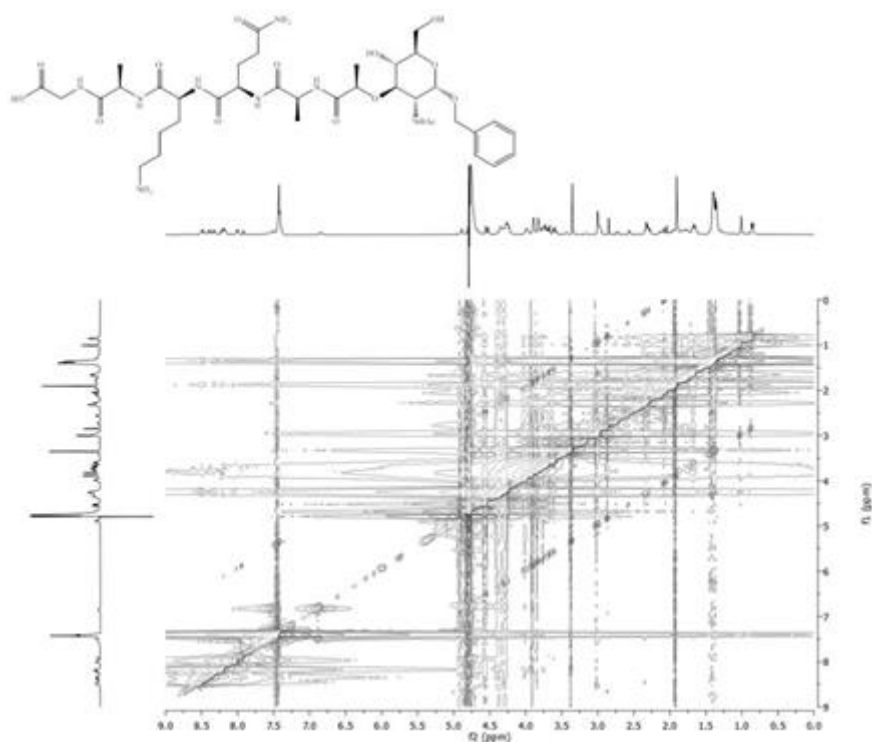


Figura 6.32 Espectro de NOESY do composto 33 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

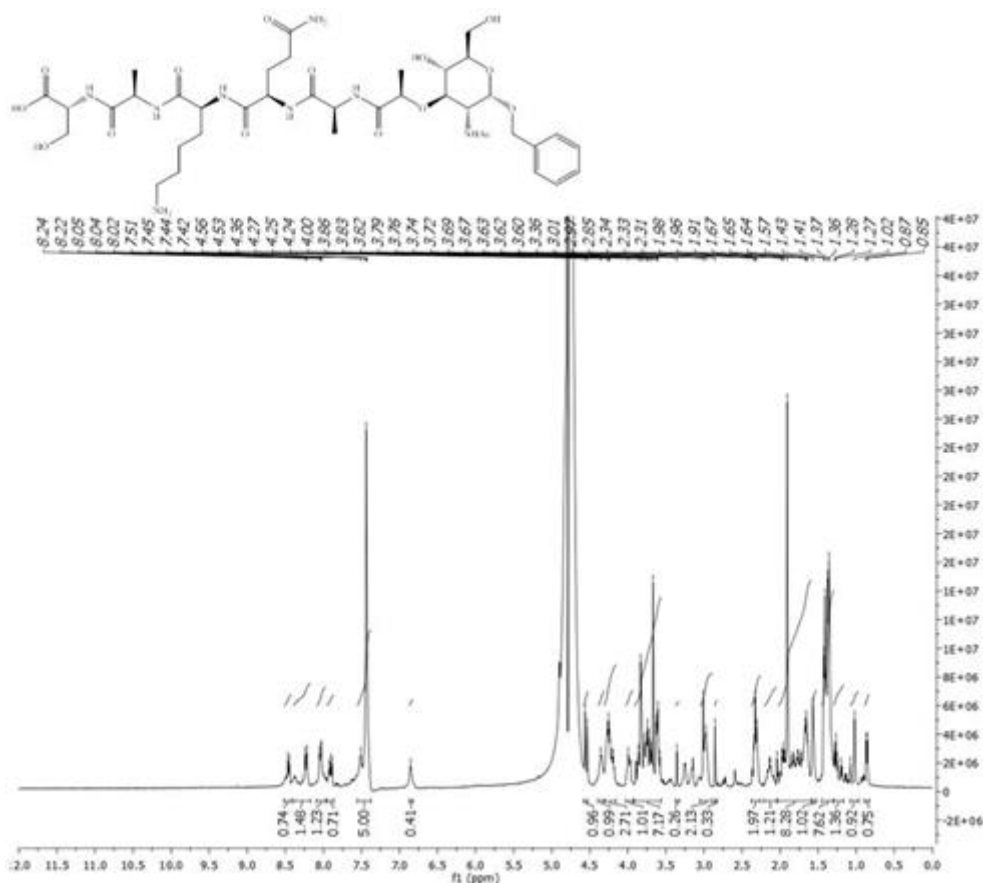


Figura 6.33 Espectro de ^1H -RMN do composto 34 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O com uma janela em F1 de 12 a 0ppm.

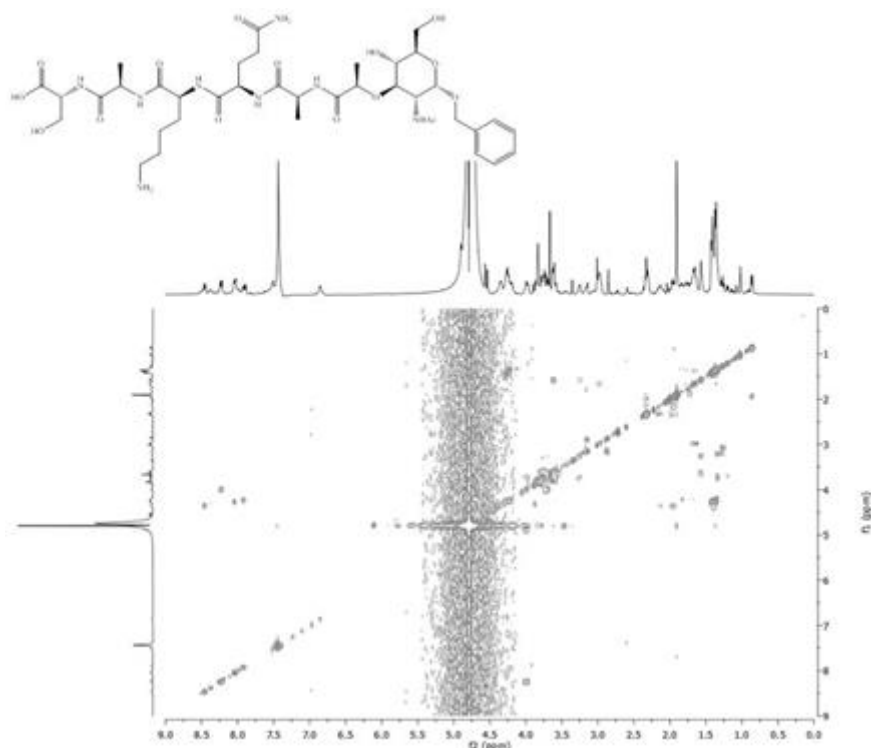


Figura 6.34 Espectro de COSY do composto 34 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D_2O em H_2O . Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

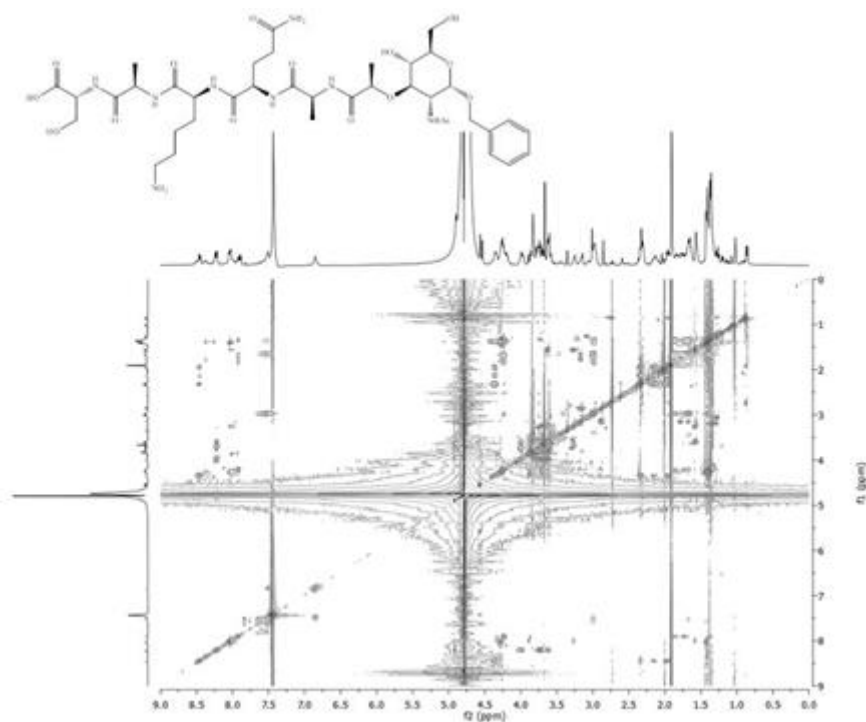


Figura 6.35 Espectro de TOCSY do composto 34 adquirido a 298K, 80ms, solvente 10% D₂O em H₂O. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

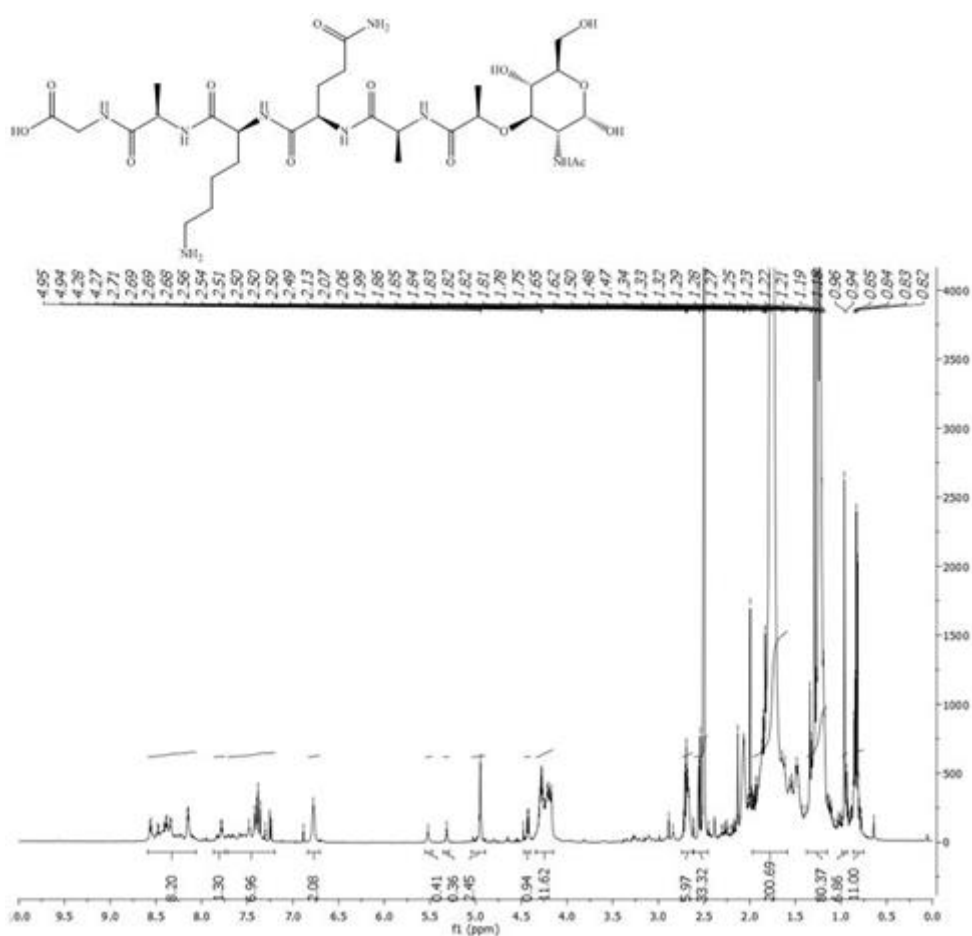


Figura 6.36 Espectro de ¹H-RMN do composto 36 adquirido a 298K, 80ms, solvente DMSO-d₆ com uma janela em F1 de 10 a 0ppm.

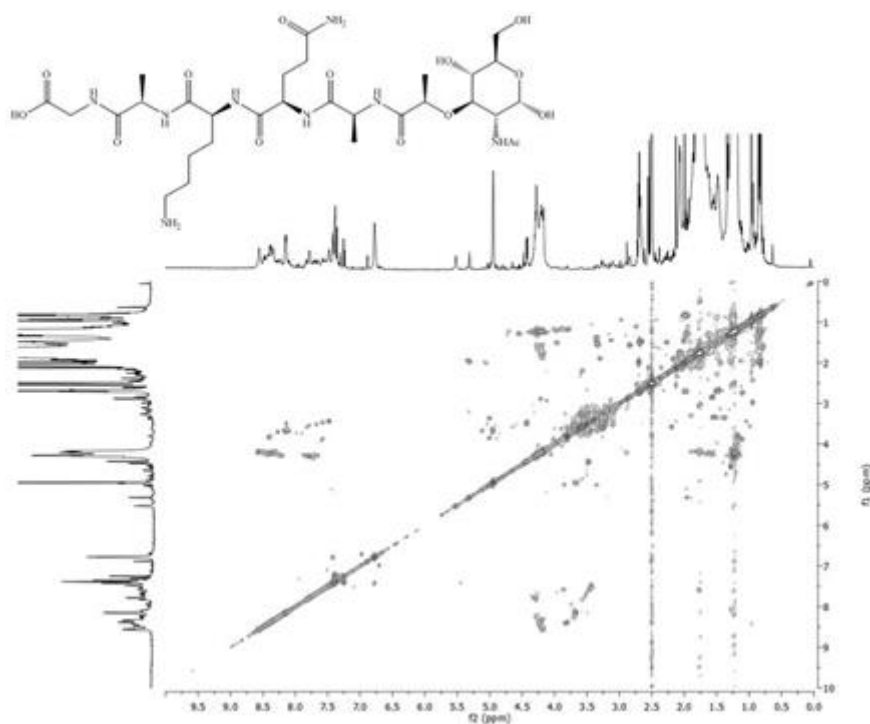


Figura 6.37 Espectro de COSY do composto 34 adquirido a 298K, 80ms, solvente DMSO-d₆. Expansão em F1 10 a 0ppm e F2 10 a 0ppm.

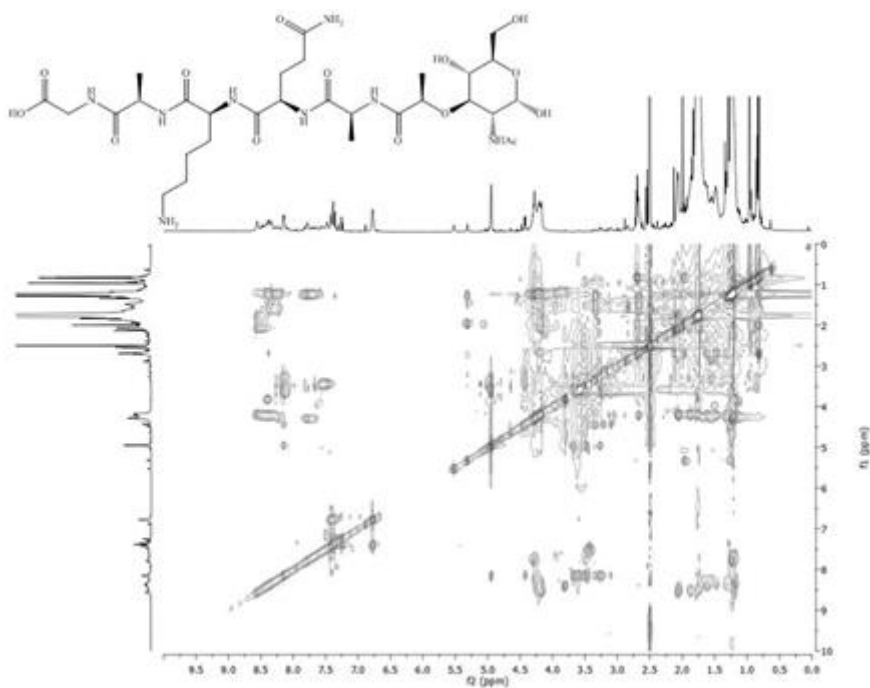


Figura 6.38 Espectro de TOCSY do composto 36 adquirido a 298K, 80ms, solvente DMSO-d₆. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

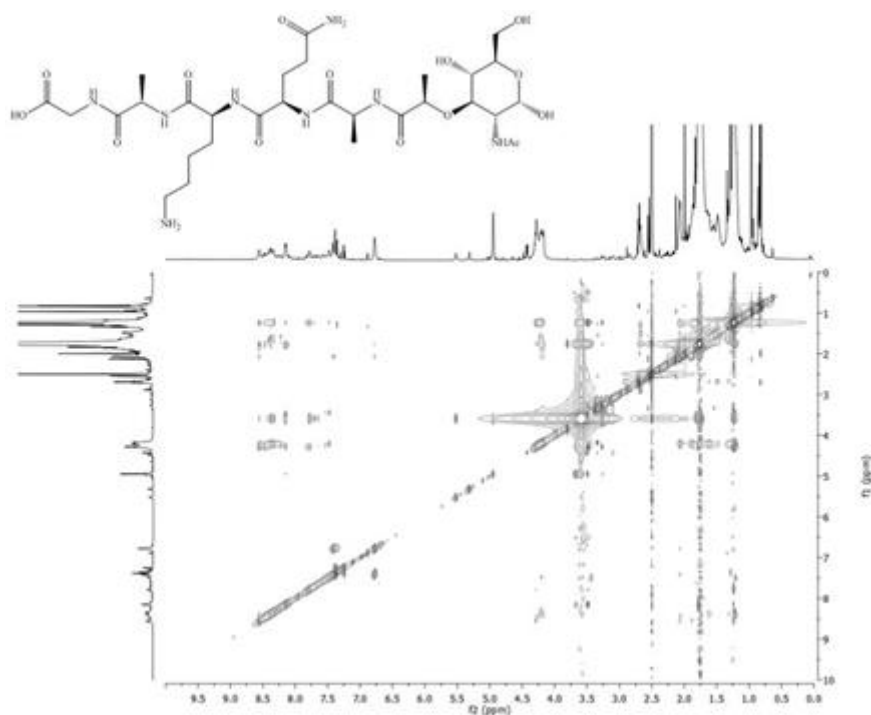


Figura 6.39 Espectro de NOESY do composto 36 adquirido a 298K, 80ms, solvente DMSO-d₆. Expansão em F1 9 a 0ppm e F2 9 a 0ppm.

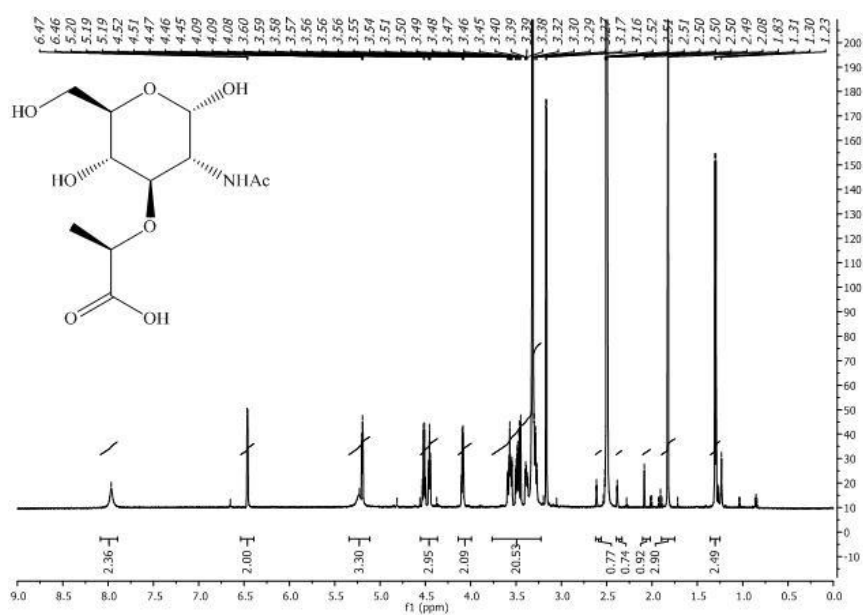


Figura 6.40 Espectro de ¹H-RMN do composto 38 adquirido a 298K, 80ms, solvente DMSO-d₆. Expansão em F1 9 a 0ppm.